

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE 1**  
**E. D. SCIENCE DE LA MATIERE, DU RAYONNEMENT ET DE L'ENVIRONNEMENT**

# **THESE**

présentée par

**Stéphanie HUGUET**

pour obtenir le titre de

**Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I**

**Spécialité: Géochimie de l'environnement**

## **Etude du devenir du cadmium dans un sédiment de curage fortement contaminé et des mécanismes d'accumulation du cadmium chez *Arabidopsis halleri***

Date de soutenance: 18 Décembre 2009

### Composition du jury

Cécile Delolme	Rapporteur	LSE ENTPE, Vaulx-en-Velin
Guillaume Echevarria	Rapporteur	ENSAIA, Vandœuvre-les-Nancy
Filip Tack	Examineur	Université de Gent, Belgique
Emmanuelle Montargès-Pelletier	Examineur	LEM, Vandœuvre-les-Nancy
Agnès Laboudigue	Co-directrice de thèse	Ecoles des Mines de Douai
Géraldine Sarret	Co-directrice de thèse	LGIT, Grenoble
Valérie Bert	Encadrante	INERIS, Verneuil-en-Halatte



**Etude du devenir du cadmium dans un  
sédiment de curage fortement contaminé et des  
mécanismes d'accumulation du cadmium chez  
*Arabidopsis halleri***







## Remerciements

Tout au long de ces années de thèse, en raison du caractère pluridisciplinaire de mon travail mais aussi parce que les échanges sont à la base de l'activité de recherche, j'ai été amené à travailler avec de nombreuses personnes qui m'ont aidé à avancer dans l'étude de ce sujet captivant mais très complexe. Je souhaite leur exprimer ici ma reconnaissance.

Cette thèse initiée et financée par la Région Nord-Pas-de-Calais et Voies Navigables de France (VNF) n'aurait pu voir le jour sans mes directrices et encadrantes de thèse : Agnès Laboudigue (ENSM), Géraldine Sarret (LGIT) et Valérie Bert (INERIS). Je les remercie de m'avoir confié ce sujet aussi transversal que motivant et pour leur grande disponibilité et leur investissement malgré des emplois du temps chargés. Merci pour votre patience dans les moments les plus difficiles de la rédaction, pour votre implication, et vos qualités tant professionnelles qu'humaines. J'ai appris beaucoup à votre contact. Encore merci pour tout.

Mes remerciements vont également aux membres de mon jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. A Cecile Delolme (LSE ENTPE) et Guillaume Echevarria (ENSAIA), pour avoir eu la gentillesse d'accepter la tâche de rapporteur. A Emmanuelle Montargès-Pelletier (LEM) et Filip Tack (Université de Gent) pour avoir examiné mon travail.

Je remercie aussi les membres présents lors des différents comités de pilotage de cette thèse pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour les remarques constructives: Ann Ruttens (Université de Hasselt), Jean-Luc Potdein (PBDS), Sébastien Denys (INERIS) et Jacques Bureau (INERIS), Claire Albin (VNF), Calire Bugner (Région Nord-Pas-de-Calais).

Les travaux menés au cours de cette thèse ont été réalisés dans différents laboratoires, dans lesquels j'ai pu côtoyer énormément de personnes qui auront sans aucun doute contribué à ma construction personnelle...

Merci,

- Aux membres du LGIT dans son ensemble pour la dynamique de laboratoire stimulante. A l'équipe Géochimie d'avant et d'après "divorce"... équipe cosmopolite toujours présente pour ses étudiants, notamment Nico, Martine, Delphine pour leur aide et leurs conseils avisés en labo. Les anciens et nouveaux thésards du LGIT et autres post doc pour leur contribution à

l'ambiance amicale qui aura caractérisé ces années. Avec une cinquantaine de doctorants recensés chaque année au LGIT, j'espère que vous comprendrez que je ne cite pas tout le monde, mais sachez que je garderai longtemps le souvenir des repas au RU, avec les 11h30 ou bien les 12h47... Une pensée particulière pour mes collègues de bureau, Anthony, Benjamin, Thomas, puis Aloé, Nadège, et pour des durées plus courtes, Sophie, Andres, Lauris, Alaa. Une spéciale dédicace à Gwen, partenaire de pauses et soutien en tout genre !!

- Aux *Chtis*,

- Les membres du défunt CNRSSP, qui m'ont accueilli avec le sourire malgré le contexte: Isabelle, Claire, Vasilica, Laurence, Laurence, Valérie, Christine, Philippe, Manon, Virginie, Mélanie, Therence, Caroline... Une pensée particulière pour Guilaine, l'incarnation même de la convivialité chti, merci pour avoir enrichi mon vocabulaire de quelques expressions chti qui sonnent tellement faux dans ma bouche, faute d'accent du sud ouest... Et une spéciale dédicace à Mathilde, partenaire de tous les jours, des plus gais aux plus durs en passant par les plus drôles, les plus colorés (pas plus de 3 couleurs bien évidemment !!), les plus festifs ou encore les plus zen, les plus pékinois et les plus clichés (argentique clic clic)...

- Les membres du département Génie Civil et Environnemental de l'Ecole des Mines de Douai, GCE 1 et GCE 2, en particulier les étudiants Mohammad, Caroline, Christophe, Mohamed, Amine... et Paul.

-A certains membres de l'Université de Lille 1: à Jean-Luc Potdevin et Philippe Recourt (PBDS) pour l'accès au MEB ; et à Pierre Saumitou-Laprade (GEPV) pour les boutures de *Arabidopsis halleri* et son intérêt pour mes travaux.

Je garderai un souvenir impérissable du Ch'nord, une Région riche pour son histoire, son patrimoine architectural et culturel, pour son ambiance, son atmosphère, ses habitants, sa chaleur humaine, sa gastronomie et ses bières, et tant de choses encore qui font qu'on verse la larme en partant comme le dit le dicton...

- Aux membres des lignes de lumières FAME, de l'ESRF de Grenoble, et LUCIA de la SLS en Suisse, qui m'ont initié aux techniques sur rayonnement synchrotron toujours dans une ambiance de travail très agréable. Merci à Olivier Proux, Jean-Louis Hazemann, Isabelle Alliot, Denis Testemale, Anne Marie Flank et Pierre Lagarde.

- A l'équipe SAT/LITEN du CEA de Grenoble pour m'avoir permis de réaliser les expériences d'autoradiographie... Merci à Véronique Barthès, Stéphanie Szenknect, Georges Gousseau pour leur aide. Une pensée particulière pour Solenn et Pierre pour les moments passés au CEA mais aussi à l'extérieur !!

- A Henk Schat du laboratoire « Ecology and Physiology of Plants, faculty of Earth and Life Sciences at Vrije Universiteit – Amsterdam) et toute son équipe, pour leur accueil très chaleureux, notamment Riet Vooijs pour son aide précieuse pour les extractions végétales, Henk Hakvoort, et les étudiants : les deux Antoine et Syallou. Merci au COST action 859 pour m'avoir permis d'effectuer cette « Short Term Scientific Mission » aux pays des tulipes.

- Et à toutes les personnes rencontrées qui ne rentrent pas dans les catégories précédentes...

Je terminerai par les amis et les proches.

J'adresse ma profonde amitié à la LCVE team, *i.e.* Marie, MPi, Fatou, Math et Tonio, et aussi Marine et Line, et les autres « bordelais » avec qui j'ai partagé les meilleurs moments des mes années fac. Aux vieux de la vieille, Caro, Marie,... Malgré la distance qui nous sépare (plus ou moins grande !!!), we keep in touch !

J'ai une pensée particulière pour Raph, qui a supporté mon manque de disponibilité, mon stress des derniers mois, faisant preuve de patience et m'apportant du réconfort...

Et puis je terminerai par mes sponsors officiels... Je ne parle ni de la SNCF, ni de Jardiland®, mais bien évidemment de mes parents, qui m'ont toujours soutenu dans mes études et m'ont fait confiance quels que soient mes choix. Merci pour ça mais surtout pour tout le reste. Je vous l'annonce, la thèse est terminée ! Vous pouvez respirer jusqu'au prochain défi !

Une petite pensée à Papi Job, le seul de mes grands-parents à avoir vu le commencement de cette aventure mais pas la fin.





## **ETUDE DU DEVENIR DU CADMIUM DANS UN SEDIMENT DE CURAGE FORTEMENT CONTAMINE ET DES MECANISMES D'ACCUMULATION DU CADMIUM CHEZ *ARABIDOPSIS HALLERI***



### **Résumé**

La maintenance des voies navigables par dragage génère de grands volumes de sédiments, souvent contaminés en métaux. Pour certains d'entre eux, un traitement par phytoextraction pourrait être envisagé. Le premier volet de ce travail vise à étudier le devenir du Cd présent dans un sédiment de curage contaminé par des métaux lors de la culture d'*A. halleri*, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd. Pour cela, un suivi des teneurs en Cd a été réalisé dans le sédiment, les parties aériennes de la plante et les lixiviats lors de la culture en pot. La présence de plantes diminue la quantité de Cd lixivié, mais ne modifie ni la fraction échangeable ni le pool phytodisponible en Cd. La spéciation a été étudiée par spectroscopie EXAFS et  $\mu$ XANES, la localisation par  $\mu$ XRF et MEB-EDX, et la biodisponibilité par DGT et extraction au  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Avant culture, le Cd est présent sous forme d'un sulfure mixte de Zn, Cd et Fe. Après 5 mois de culture, cette espèce est totalement oxydée en présence de plantes et presque totalement dans les pots sans plante. Les espèces de Cd néoformées sont des complexes Cd-acides organiques et du Cd-phosphate. Le second volet de ce travail porte sur les mécanismes d'accumulation du Cd dans les parties aériennes d'*A. halleri*. Après culture en hydroponie, l'analyse des parties aériennes par autoradiographie en utilisant  $^{109}\text{Cd}$  montre que le métal est transféré aussi bien dans les feuilles jeunes que les matures, ces dernières montrant un enrichissement des tissus périphériques. L'analyse des feuilles par spectroscopie EXAFS a montré que le Cd était lié principalement à des ligands organiques de type COOH/OH, et de façon minoritaire à des ligands de type thiols.



# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1. POLLUTIONS DES SEDIMENTS.....</b>	<b>11</b>
I.1.1. DEFINITION ET PROBLEMATIQUES DES ELEMENTS TRACE METALLIQUES (ETM) DANS L'ENVIRONNEMENT .....	11
I.1.2. SOURCES D'ETM .....	13
I.1.2.1. L'industrie .....	13
I.1.2.2. L'agriculture .....	16
I.1.2.3. Les activités urbaines et domestiques.....	16
<b>I.2. GESTION DES SEDIMENTS EXTRAITS.....</b>	<b>18</b>
I.2.1. LA NOTION DE DECHET APPLIQUEE AUX SEDIMENTS .....	18
I.2.2. LE DEVENIR DES SEDIMENTS EXTRAITS .....	19
I.2.2.1. La valorisation : le réemploi des sédiments.....	19
I.2.2.2. La mise en décharge .....	20
I.2.2.3. Le dépôt ou le stockage.....	20
I.2.2.4. Le traitement des sédiments.....	22
I.2.3. TECHNIQUES DE PHYTOREMEDIATION POUR LA GESTION DES SEDIMENTS DE CURAGE. ....	24
I.2.3.1. Phytoremédiation : définition .....	24
I.2.3.2. La phytoextraction .....	25
<b>I.3. SPECIATION ET BIODISPONIBILITE DU Cd DANS LES SEDIMENTS.....</b>	<b>31</b>
I.3.1. CONCEPT DE SPECIATION ET BIODISPONIBILITE DANS LES SUBSTRATS .....	31
I.3.1.1. Biodisponibilité des ETM dans un substrat type sol-sédiment.....	31
I.3.1.2. Spéciation des ETM dans un substrat type sol-sédiment.....	32
I.3.2. MECANISMES DE FIXATION .....	32
I.3.3. CONSTITUANTS DU SEDIMENT : LES PHASES PORTEUSES DES METAUX ET LEUR REACTIVITE VIS-A-VIS DU CADMIUM.....	35
I.3.3.1. Les argiles .....	36
I.3.3.2. La matière organique (MO).....	36
I.3.3.3. Les oxyhydroxydes de fer et de manganèse .....	37
I.3.3.4. Les carbonates .....	39
I.3.3.5. Les sulfures .....	40
I.3.3.6. Les phosphates .....	41
I.3.4. METHODES POUR DETERMINER LA SPECIATION ET LA MOBILITE/BIODISPONIBILITE DU Cd DANS LE SEDIMENT .....	43
I.3.4.1. Méthodes chimiques pour évaluer la biodisponibilité .....	43
I.3.4.2. Méthodes biologiques.....	50
I.3.4.3. Méthodes physiques.....	52
<b>I.4. EVOLUTION DE LA MOBILITE DU Cd PRESENT DANS UN SEDIMENT DE MIS EN DEPOT ET APRES UNE CULTURE DE PLANTE .....</b>	<b>63</b>
I.4.1. IMPACT DE LA MISE EN DEPOT DE SEDIMENT .....	63

I.4.2. FACTEURS ABIOTIQUES INFLUENÇANT L'EVOLUTION DES ETM DANS LES SEDIMENTS .....	64
I.4.2.1. Potentiel d'oxydoréduction (Eh) et lessivage .....	65
I.4.2.2. Cycles de séchages humidifications .....	65
I.4.3. FACTEURS BIOTIQUES DE L'EVOLUTION DES ETM DES SEDIMENTS : EFFET DES PLANTES DANS LA RHIZOSPHERE .....	67
I.4.3.1. Influence des plantes sur le pH et potentiel d'oxydoréduction .....	67
I.4.3.2. Conséquences sur la spéciation des contaminants métalliques .....	71
<b>I.5. Cd ET AUTRES METAUX DANS LES PLANTES, EN PARTICULIER LES HYPERACCUMULATRICES .....</b>	<b>73</b>
I.5.1. REPONSE DES PLANTES AUX ETM .....	73
I.5.2. TOLERANCE DES PLANTES AUX POLLUANTS METALLIQUES .....	74
I.5.3. L'HYPERACCUMULATION .....	75
I.5.4. MECANISMES DE TOLERANCE ET D'HYPERACCUMULATION .....	76
I.5.4.1. Les bases génétiques .....	76
I.5.4.2. Mécanismes d'hyperaccumulation .....	78
I.5.4.3. Méthodes pour étudier la localisation et la spéciation du Cd dans les plantes .....	79
I.5.4.4. Conséquences actuelles sur la localisation du Cd dans les plantes .....	81
I.5.4.5. Conséquences actuelles sur la spéciation du Cd dans les plantes .....	82
<b>I.6. CONCLUSION BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>84</b>

## **CHAPITRE II : SUIVI MACROSCOPIQUE DE LA CULTURE D'*A. HALLERI* SUR SEDIMENT ET IMPACT DE CETTE CULTURE SUR LA SPECIATION ET LA LOCALISATION DU Cd PRESENT DANS LE SEDIMENT ..... 91**

<b>II.1. MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>93</b>
II.1.1. LE SEDIMENT .....	93
II.1.1.1. Prélèvement et conditionnement du sédiment .....	93
II.1.2. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX .....	95
II.1.2.1. Composition granulométrique .....	95
II.1.2.2. Mesure des paramètres physico-chimiques .....	95
II.1.2.3. Concentration pseudo-totale en éléments majeurs et traces du sédiment initial et des fractions granulométriques .....	96
II.1.3. CARACTERISTIQUES DU SEDIMENT .....	97
II.1.4. MATERIEL VEGETAL .....	101
II.1.5. MISE EN CULTURE ET CONCEPTION DE L'EXPERIENCE .....	104
II.1.5.1. Mise en culture .....	104
II.1.5.2. Détail du suivi macroscopique : description des analyses réalisées .....	106
II.1.6. ETUDE DE LA SPECIATION AVANT ET APRES CULTURE DU Cd PRESENT DANS LE POT .....	109
II.1.6.1. Préparations des échantillons .....	109
II.1.6.2. Identification des phases porteuses individuelles .....	111
II.1.6.3. Détermination de la spéciation et quantification des espèces chimiques : techniques de spectroscopies d'absorption des rayons X .....	113



<b>II.2. SUIVI MACROSCOPIQUE DE LA PLANTE ET DU SEDIMENT LORS DE LA CULTURE :</b>	
<b>RESULTATS .....</b>	<b>121</b>
II.2.1. PARAMETRES DE CROISSANCE DES PLANTES .....	121
II.2.2. ACCUMULATION DU Cd ET DU Zn DANS LES PARTIES AERIENNES DES PLANTES .....	122
II.2.3. SUIVI DU SEDIMENT .....	126
II.2.3.1. pH et carbone total .....	126
II.2.3.2. Concentration pseudo-totales en métaux dans le sédiment.....	127
II.2.3.3. Concentrations en métaux et sulfates dans les lixiviats .....	127
II.2.3.4. Biodisponibilité des métaux .....	130
II.2.4. DISCUSSION .....	135
II.2.4.1. Paramètres de croissance des plantes.....	135
II.2.4.2. Accumulation du Cd et du Zn dans les parties aériennes de la plante.....	137
II.2.4.3. Biodisponibilité des métaux .....	139
II.2.4.4. Bilan de matière.....	140

<b>II.3. CARACTERISATION DE LA SPECIATION ET DE LA LOCALISATION DU Cd DANS LE SEDIMENT APRES CULTURE .....</b>	<b>146</b>
II.3.1. ETUDE DES SPECTRES DE COMPOSES MODELES .....	146
II.3.1.1. Spectres EXAFS au seuil K de Cd .....	146
II.3.1.2. Spectres XANES au seuil L <sub>III</sub> de Cd .....	151
II.3.1.3. Spectres XANES de S .....	152
II.3.2. SPECIATION DU Cd DANS LE SEDIMENT AVANT CULTURE .....	153
II.3.2.1. Détermination de la spéciation moyenne de Cd .....	153
II.3.2.2. Détermination des espèces individuelles du Cd sur le sédiment préparé: micro-analyses.....	160
II.3.2.3. Spéciation dans le sédiment initial avant culture : bilan .....	166
II.3.3. SPECIATION DU SEDIMENT APRES CULTURE .....	167
II.3.3.1. Détermination de l'espèce moyenne du Cd présent dans le sédiment après culture .....	167
II.3.3.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : simulation numérique.....	171
II.3.3.3. Identification des phases porteuses individuelles de Cd présent dans le sédiment après culture : Analyses SEM-EDS, $\mu$ XRF et $\mu$ XANES.....	174
II.3.3.4. Spéciation dans le sédiment après culture : bilan .....	186
II.3.3. DISCUSSION .....	188
II.3.3.1. Spéciation dans le sédiment avant culture .....	188
II.3.3.2. Spéciation dans le sédiment après culture .....	190

## **CHAPITRE III : LOCALISATION ET SPECIATION DU CADMIUM DANS LES PARTIES AERIENNES D'A. HALLERI ..... 197**

<b>III.1. LOCALISATION DU Cd DANS A. HALLERI.....</b>	<b>200</b>
<i>Cd localization and compartmentalization in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri studied by autoradiography. ....</i>	<i>200</i>
III.1.1. ABSTRACT .....	201
III.1.2. INTRODUCTION.....	201
III.1.3. MATERIALS AND METHODS .....	204
III.1.3.1. Plant material and culture .....	204

III.1.3.2. Root growth assessment and plant aspect.....	205
III.1.3.3. Zn and Cd accumulation in aerial parts of plants.....	205
III.1.3.4. Cd localization and compartmentalization in aerial parts of plants .....	205
III.1.3.5. Statistical analyses .....	208
III.1.4. RESULTS .....	208
III.1.4.1. Assessment of root growth and plant aspect.....	208
III.1.4.2. Cd and Zn concentrations in aerial parts of plants .....	208
III.1.4.3. Comparison of Cd accumulation and radioactive intensity .....	209
III.1.4.4. Localization of Cd at the rosette scale .....	210
III.1.4.5. Cd compartmentalization at leaf scale.....	211
III.1.5. DISCUSSION .....	212
III.1.5.1. Zn and Cd accumulation.....	212
III.1.5.2. Cd localization and compartmentalization at plant and leaf scale. ....	214
III.1.6. ACKNOWLEDGMENTS .....	216
III.1.7. REFERENCES.....	217
 <b>III.2. SPECIATION DU CD DANS LES PARTIES AERIENNES D'A. HALLERI .....</b>	<b>231</b>
III.2.1. MATERIEL ET METHODES.....	231
III.2.1.1. Analyses EXAFS : préparation des échantillons et acquisition des données. ....	231
III.2.1.2. Analyses chimiques : détermination des concentrations en phytochélatines (PC) et glutathion (GSH).....	232
III.2.2. RESULTATS .....	235
III.2.2.1. Détermination de la spéciation moyenne du Cd : exploitation des spectres par combinaison linéaire. ....	235
III.2.2.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : exploitation des spectres par simulation numérique.....	242
III.2.2.3. Concentrations en phytochélatines et glutathion. ....	244
III.2.3. DISCUSSION .....	249
 <b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>255</b>
 <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>263</b>
 <b>ANNEXES.....</b>	<b>297</b>

## Table des tableaux

### Chapitre I

---

Tableau I-1 : Principales utilisations industrielles du Cd et de ses composés dérivés....	15
Tableau I-2 : Impact de l'activité humaine sur la teneur en métaux dans les sédiments.	16
Tableau I-3 : Teneurs en métaux dans les principaux fertilisants agricoles.....	16
Tableau I-4 : Niveaux S1 relatifs aux éléments et composés traces, définis dans l'arrêté du 9 août 2006.....	19
Tableau I-5 : Plantes hyperaccumulatrices d'ETM.....	75

### Chapitre II

---

Tableau II-1 : Principales caractéristiques du sédiment.....	98
Tableau II-2 : Concentration en As, Cd, Cu, Pb et Zn contenu dans le sédiment avant culture. ....	99
Tableau II-3 : Principales caractéristiques du sol contaminé d'Auby (Fr) et du sol non contaminé des Hautes Fagnes (Be).....	103
Tableau II-4: Concentration en métaux ( $\text{mg kg}^{-1}$ PS) dans les parties aériennes de <i>A. halleri</i> prélevées in situ sur un site contaminé et un site non contaminé .....	104
Tableau II-5 : Biomasse (g) des parties aériennes de <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET juste avant le transfert des plantes sur sédiment et à la fin de l'expérience sur sol agricole .....	136
Tableau II-6 : Distribution massique du Cd, Zn et Cu entre les matrices étudiées : le sédiment, les parties aériennes des plantes et les lixiviats avant et pendant la culture d' <i>A. halleri</i> pour les deux origines. ....	148
Tableau II-7: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour les composés de références .....	150
Tableau II-8: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment initial à <i>ti</i> .....	155
Tableau II-9 : Distribution des espèces de Cd déterminée par combinaison linéaire pour le sédiment initial, les fractions granulométriques et le sédiment mis en suspension sous eau (MSE). ....	158
Tableau II-10 : Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment MSE.....	159
Tableau II-11 : Distribution des espèces de Cd déterminée par combinaisons linéaires pour le sédiment initial et pour des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment initial (spot 1 et spot 2).....	164
Tableau II-12: Distribution des espèces de S déterminée par combinaison linéaire pour le sédiment initial et pour des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment initial (spot 1 et spot 2).....	165

Tableau II-13 : Spéciation du Cd simulée par combinaison linéaire des spectres EXAFS au seuil K du Cd pour le sédiment initial, le sédiment mis en suspension dans l'eau (MSE), le sédiment après 5 mois de culture par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET et le sédiment du pot témoin non végétalisé à t6.....	170
Tableau II-14: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment initial à <i>ti</i> et le sédiment MSE, le sédiment après 5 mois de culture par <i>A. halleri</i> d'origine MET et d'origine N-MET et le sédiment du pot témoin non végétalisé à <i>t6</i> .....	173
Tableau II-15 : Récapitulatif des associations géochimiques rencontrées pour les différents spots plus ou moins riches en Cd analysés sur la lame mince de sédiment végétalisé par <i>A. halleri</i> (d'origine MET pour les points 19, 16, 13 et N-MET pour l' « orga »).....	181
Tableau II-16 : Spéciation du Cd, simulée par combinaisons linéaires, des espèces individuelles trouvées dans le sédiment initial et dans le sédiment après 5 mois de culture par <i>A. halleri</i> . Les combinaisons linéaires ont été simulées avec 4 composantes au maximum.....	183
Tableau II-17: Spéciation du S simulée par combinaison linéaire pour le sédiment initial et pour des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment initial (spot 1 et spot 2). Les combinaisons linéaires ont été simulées avec 5 composantes au maximum.....	185

### Chapitre III

---

Table 1: Design of experiments: Number of MET and N-MET <i>A. halleri</i> clones and leaves related to experiment 1 and 2 where plants were hydroponically cultivated for 3 and 9 weeks in presence of various Cd and Zn concentrations .....	222
Table 2: Assessment of MET and N-MET <i>A. halleri</i> clones to tolerance to culture conditions, i.e. in presence of various Cd and Zn concentrations in hydroponic solutions during 9 weeks .....	223
Table 3: Percentage of total radioactive intensity measured in different compartments of a representative leaf of <i>A. halleri</i> MET and N-MET, after 3- and 9-week exposure to <sup>109</sup> Cd and various Cd and Zn concentrations conditions in hydroponic solutions.....	224
Tableau III-4 : Récapitulatif des échantillons étudiés par spectroscopie EXAFS (FM : feuilles matures, FJ : feuilles jeunes).....	232
Tableau III-5: Récapitulatif du matériel végétal analysé en fonction des conditions expérimentales testées et au cours de l'expérience .....	233
Tableau III-6: Distribution des deux principales familles d'espèces de Cd déterminée par combinaison linéaire des spectres EXAFS des plantes (% molaire).....	240
Tableau III-7: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour des feuilles d' <i>Arabidopsis halleri</i> pour trois traitements en Cd et Zn. ....	244

# Table des figures

## Introduction

---

Figure 0-1 : Réseau hydrographique de la France comprenant le réseau navigable. ....	1
--	---

## Chapitre I

---

Figure I-1 : Opération d'épandage sur un champ.....	20
Figure I-2 : Stockage et régalaage des sédiments fluviaux curés. ....	21
Figure I-3 : Devenir des sédiments curés à l'échelle nationale et pour les cours d'eau gérés par VNF pour l'année 2002.....	24
Figure I-4 : Processus de phytoextraction. Ce schéma illustre l'assimilation des contaminants contenus dans un substrat par les racines de la plante et le mouvement des contaminants des racines vers les parties aériennes de la plante....	27
Figure I-5. Principales interactions entre un atome ou une molécule et un solide à l'interface solide/liquide .....	35
Figure I-6 : Proportions des espèces zincifères dans l'ensemble des échantillons de sédiment de curage soumis à la phytostabilisation par des plantes, avec amendements et de sédiment sans plante ni amendement.....	43
Figure I-7 : Schéma de montage d'un dispositif DGT .....	48
Figure I-8 : Représentation schématique du gradient de concentration en élément à l'interface entre le dispositif DGT et le sol.. ....	49
Figure I-9 : Relation de proportionnalité entre l'indicateur $C_E$ et la concentration en Zn et en Cd dans les feuilles de la laitue cultivées sur sol contaminé de Mortagne du Nord affichant des concentrations totales en Zn oscillant entre 103 et 360 mg $kg^{-1}$ et entre 0.9 et 2.9 mg $kg^{-1}$ pour le Cd .....	50
Figure I-10 : Montages expérimentaux en transmission et en détection de fluorescence .....	53
Figure I-11: Principe physique de la spectroscopie d'absorption des rayons X, exemple d'un spectre au seuil K du Cd. ....	54
Figure I-12 : Rayonnements secondaires produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon dans un Microscope Electronique à Balayage. ....	58
Figure I-13 : Représentation schématique des principales interactions entre le système racinaire et le sol.....	68
Figure I-14: Effets de la concentration en polluant métallique présent dans le sol sur la biomasse produite par les plantes .....	73
Figure I-15 : Les trois différentes stratégies de l'assimilation des métaux adoptées par les plantes en relation avec la concentration en métaux dans les sols.....	74
Figure I-16 : Vue d'ensemble de la compréhension actuelle des adaptations pour l'hyperaccumulation des métaux, en particulier du Zn. ....	79

## Chapitre II

---

Figure II-0: Schéma récapitulatif des paramètres de suivi en fonction des matrices étudiées. (Chaque analyse est faite en triplicat au minimum, excepté pour l'étude de spéciation).....	92
Figure II-1 : Carte de la zone de curage et opération de curage.....	94
Figure II-2 : Homogénéisation du sédiment.....	94
Figure II-3 : Opération de tamisage par voie humide .....	95
Figure II-4 : Pourcentage massique de chaque fraction granulométrique constituant le sédiment.....	98
Figure II-5 : Concentration en Cd pour chaque fraction granulométrique constituant le sédiment.....	100
Figure II-6 : Distribution du Cd pour chaque fraction granulométrique.....	101
Figure II-7 : Localisation des sites de prélèvement des graines.....	102
Figure II-8 : Culture en conditions contrôlées : (A) Phase de germination d' <i>A. halleri</i> sur compost. (B) Pots contenant <i>A. halleri</i> sur sédiment.....	105
Figure II-9 : Dispositif expérimental de déploiement des DGT dans le sédiment : vue de profil et vue du dessus. ....	108
Figure II-10 : (A) Pot de sédiment végétalisé après démontage et coupe en deux parties. Sur cette coupe, la zone de prélèvement, la zone du collet de la plante sont repérées. (B) Bloc de sédiment prélevé avant lyophilisation. (C) lame mince obtenue à partir du bloc de sédiment prélevé. ....	110
Figure II-11 : Schéma récapitulatif des analyses réalisées par spectroscopie à rayons X sur les différents échantillons de sédiment étudiés.....	111
Figure II-12 : Schéma simplifié de la ligne de lumière FAME dédiée à la XAS.....	114
Figure II-13 : Organigramme de traitement des données EXAFS .....	118
Figure II-14 : Schéma de la ligne de lumière LUCIA.....	119
Figure II-15 : Biomasse des parties aériennes de <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET juste avant le transfert des plantes sur sédiment et pour chaque mois du suivi.....	122
Figure II-16 : Concentrations en Cd, Zn et Cu [mg.kg <sup>-1</sup> ] mesurées dans les parties aériennes de <i>A. halleri</i> d'origine MET et d'origine N-MET juste avant le transfert des plantes sur sédiment (ti) et pour chaque mois du suivi .....	125
Figure II-17: Concentrations en Cd, Zn et Cu [mg.L <sup>-1</sup> ] mesurées dans les lixiviats collectés pour les pots non végétalisés et pour les pots végétalisés par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET .....	129
Figure II-18 : Concentrations en sulfates (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ) [mg.L <sup>-1</sup> ] mesurées dans les lixiviats collectés pour les pots contenant du sédiment non végétalisé et végétalisé par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET au cours du suivi.....	130
Figure II-19 : Concentrations en Cd, Zn et Cu échangeables [mg.kg <sup>-1</sup> ] dans le sédiment végétalisé par les plantes MET et N-MET de t1 à t5, et dans le sédiment des pots témoins (non végétalisés) seulement à ti et t6 .....	132

Figure II-20 : Concentrations en Cd, Zn et Cu échangeables [mg.kg <sup>-1</sup> ] et phytodisponibles [mg.L <sup>-1</sup> ] dans le sédiment végétalisé par les plantes MET et N-MET de t1 à t5.....	134
Figure II-21: Spectres EXAFS des composés de références enregistrés au seuil K du Cd où le Cd est sous la forme minérale.....	147
Figure II-22: Spectres EXAFS des composés de références enregistrés au seuil K du Cd où le Cd est associé à des composés organiques.....	148
Figure II-23: Spectres EXAFS des composés de références enregistrés au seuil K du Cd où le Cd est associé au S.....	149
Figure II-24 : Spectres EXAFS expérimentaux enregistrés au seuil K du Cd des composés références CdCO <sub>3</sub> , Cd-phosphate, Cd-alginate, CdS et (Zn, Cd,Fe)S et les spectres obtenus par simulation FEFF .....	150
Figure II-25: Spectres XANES des composés de référence enregistrés au seuil LIII du Cd.....	155
Figure II-26: Spectres XANES des composés de références enregistrés au seuil K du S.....	153
Figure II-27 : Spectre EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial et ajustement par combinaison linéaire à 1 composante.....	154
Figure II-28: Spectres EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial à <i>ti</i> et spectres obtenus par simulation FEFF, et les transformées de Fourier associées.. .....	155
Figure II-29 : Spectres XANES enregistré au seuil L <sub>III</sub> du Cd sur une pastille de sédiment préparé et ajustement par combinaison linéaire à 1 composante. ....	156
Figure II-30 : Spectres EXAFS au seuil K du Cd enregistrés sur les fractions granulométriques du sédiment initial obtenues par tamisage sous eau, sédimentation dans une colonne d'eau (loi de Stokes) et centrifugation.....	157
Figure II-31: Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés sur le sédiment initial, sur le composé de référence (Zn,Cd,Fe)S, sur le sédiment ayant subi les étapes d'humectation/dessiccation et sur la fraction grossière.....	159
Figure II-32: Transformées de Fourier du spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment mis en suspension sous eau (MSE), et du meilleur spectre obtenu par simulation FEFF. ....	159
Figure II-33: Images MEB en électrons rétrodiffusés et zoom de la zone étudiée, spectre EDS enregistré sur un spot riche en Cd sur la lame de sédiment initial (spot 2), cartes élémentaires pour le Fe, Zn, Cd et S de cette région.. .....	161
Figure II-34: Images MEB en électrons rétrodiffusés et cartes de répartition de S, Cd, P, Si et Al obtenues sur un grain du sédiment initial (lame mince) par $\mu$ XRF. Rapport des intensités de fluorescence S/Cd et P/Cd pour les spots 1 et 2. Diagrammes de corrélation S-Cd et P-Cd de la zone cartographiée. ....	162
Figure II-35: Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil L <sub>III</sub> du Cd sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé et sur des composés de référence présentant Cd associé à O et à du S sous forme réduite. ....	163

Figure II-36: Simulation des spectre XANES enregistrés au seuil $L_{III}$ du Cd sur le sédiment préparé et sur les spots 1 et 2 par combinaison linéaire à 2 composantes au maximum.....	164
Figure II-37: Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé et sur deux types de composés de référence : un sulfate ( $CdSO_4$ ) et deux sulfures métalliques ( $CdS$ et $(Zn, Cd, Fe)S$ ).....	165
Figure II-38 : Spectres XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé et spectres de la meilleure simulation obtenue par combinaison linéaire à 4 composantes au maximum.....	166
Figure II-39: Spectres EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial à $t_i$ , et du sédiment après 5 mois de culture par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET.....	168
Figure II-40: Superpositions des TF des spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment des pots végétalisés par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET et du pot témoin.....	168
Figure II-41 : Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment du pot témoin à $t_6$ , des pots végétalisés par <i>A. halleri</i> à $t_5$ et du sédiment mis en suspension dans l'eau (MSE), ainsi que le spectre de la meilleure simulation obtenue.....	170
Figure II-42 : Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés sur le sédiment initial à $t_i$ , sur le sédiment après 5 mois de culture par <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET, sur le sédiment du pot témoin non végétalisé à $t_6$ et sur le sédiment MSE.....	171
Figure II-43 : Transformées de Fourier du spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment des pots végétalisés par <i>A. halleri</i> et du pot témoin, et simulations FEFF.....	173
Figure II-44 : Image MEB en électrons rétrodiffusés d'une particule (nommée particule 19) du sédiment après culture contenant des zones riches en Cd. Particule 19 observée à la loupe binoculaire. Spectre EDS enregistré sur un spot riche en Cd du grain 19.....	175
Figure II-45 : Image MEB en électrons rétrodiffusés de la zone riche en Cd du grain 19 et cartes élémentaires EDS associées pour le S, Fe, Zn, Cd et P.....	175
Figure II-46 : Cartes élémentaires enregistrées en $\mu$ -XRF de la distribution du Cd, S, P, Si et Al, sur le grain 19 issu du sédiment végétalisé par <i>A. halleri</i> d'origine MET à $t_5$ . Diagramme des corrélations élémentaires correspondantes.....	176
Figure II-47 : Images MEB en électrons rétrodiffusés d'un grain du sédiment végétalisé (origine MET) après culture contenant une zone riche en Cd (spot 16). Spectre EDS enregistré dans la zone enrichie en Cd. Distribution élémentaire du Cd, S et P sur la zone d'étude.....	177
Figure II-48 : Image MEB en électrons rétrodiffusés du grain du sédiment végétalisé après culture contenant une zone riche en Cd : le spot 13. Spectre EDS enregistré sur un point du spot 13 enrichi en Cd.....	178
Figure II-49: Image MEB en électrons rétrodiffusés du grain du sédiment végétalisé après culture contenant une zone riche en Cd. Distribution élémentaire en $\mu$ -XRF du Cd, S, P, Si et Al sur la zone d'étude.....	179



Figure II-50: Spot « orga » observé au microscope optique. Image MEB en électrons rétrodiffusés de la zone « orga » et cartographies élémentaires associées. Spectre EDS enregistré sur ce spot.....	180
Figure II-51: Spot « orga » observé au microscope optique. Distribution élémentaire par $\mu$ -XRF du Cd, S, P et Si sur la zone d'étude. ....	180
Figure II-52: Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil $L_{III}$ du Cd sur les spots enrichis en Cd repérés sur la lame de sédiment après culture d' <i>A. halleri</i> : points 19a, 19b et 19c du grain 19, le point 16, le point 13 et le point « orga ». Les spectres des spots 1 et 2 du sédiment préparé sont aussi représentés à titre de comparaison.....	182
Figure II-53: Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil $L_{III}$ du Cd dans les zones riches en Cd du sédiment végétalisés par <i>A. halleri</i> à $t_5$ , et ajustement des spectres par combinaison linéaire.....	183
Figure II-54: Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots enrichis en Cd repérés sur la lame de sédiment après culture d' <i>A. halleri</i> : points 19a, 19b et 19c du grain 19, le point 16, le point 13 et l' « orga ».....	184
Figure 55 : Spectres $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots riches en Cd repéré dans le sédiment des pots végétalisés par <i>A. halleri</i> à $t_5$ , ainsi que le spectre associé de le meilleur ajustement obtenu par combinaison linéaire.....	186
Figure II-56: Proportions des espèces de Cd dans l'ensemble des échantillons de sédiment avant et après culture déterminées par simulation des spectres EXAFS expérimentaux. ....	187

### Chapitre III

---

Figure III-0: Schéma récapitulatif des expériences et analyses réalisées.....	199
Figure 1: Example of quantification of the radioactive intensities in the leaf compartments of a plant after 3 and 9 weeks of exposure.....	225
Figure 2: Zn and Cd concentrations measured in aboveground parts of <i>A. halleri</i> from metalicolous (MET) and non-metallicolous (N-MET) origins after 3 weeks and 9 weeks exposure time to various Cd and Zn concentrations.....	226
Figure 3: Radioactive intensity per unit of surface measured in the aerial parts measured in the autoradiography experiment as a function of Cd concentration in the aerial parts measured in the Cd accumulation experiment by AAS. ....	227
Figure 4: Photographs and autoradiographs of <i>A. halleri</i> MET exposed for 3 and 9 weeks to the $^{*}C_{20/30}$ treatment. ....	228
Figure 5: Photographs and their associated autoradiographs of leaves of <i>A. halleri</i> MET and N-MET exposed for 9 weeks to $^{*}C_{5/30}$ and $^{*}C_{20/30}$ treatments. ....	229
Figure 6: Radioactive intensities per unit of surface measured in different compartments of a representative mature leaf of <i>A. halleri</i> from MET origin, after 3 and 9 weeks exposure to $^{109}Cd$ , for “ $20\mu M$ Cd + $30\mu M$ Zn” condition.....	230
Figure III-7 : Clones d' <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET après 9 semaines de culture en hydroponie sur différentes concentrations en Cd et Zn. ....	235

Figure III-8: Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur des échantillons de feuilles jeunes et matures d' <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique .....	236
Figure III-9: Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur des échantillons de feuilles jeunes et matures d' <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique .....	237
Figure III-10: Transformées de Fourier superposées des spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur les échantillons de feuilles jeunes et matures d' <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique .....	238
Figure III-11: Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd et TF associées, pour les échantillons de plantes présentant des niveaux de contribution de l'espèce Cd-thiols représentatifs, à savoir les extrêmes : 0%, 10% et 40% de Cd-thiols .....	239
Figure III-12 : Distribution des deux familles d'espèce de Cd dans les échantillons, après normalisation des pourcentages. ....	241
Figure III-13: Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur les feuilles d' <i>Arabidopsis halleri</i> pour trois traitements en Cd et Zn dans la solution, et spectres obtenus par simulation FEFF avec seulement du O pour la première couche et avec du S et du O pour la première couche. ....	243
Figure III-14: Chromatogramme obtenu pour un échantillon d' <i>A. halleri</i> d'origine N-MET ayant été cultivé pendant 9 semaines sur solution hydroponique contenant 0µM de Cd et 30 µM de Zn. ....	245
Figure III-15: Concentrations en glutathion (GSH - µmol g <sup>-1</sup> ) mesurées dans les parties aériennes d' <i>A. halleri</i> MET à différents temps d'exposition (4 et 14 jours, 3 et 9 semaines) pour les différentes concentrations en Cd et Zn testées .....	247
Figure III-16: Concentrations en glutathion (GSH - µmol g <sup>-1</sup> ) mesurées dans les parties aériennes d' <i>A. halleri</i> MET et N-MET après 3 semaines et 9 semaines pour les différentes concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique testées.....	247
Figure III-17 : Diagramme de corrélation des teneurs en GSH et en Cd ou en Zn dans les parties aériennes d' <i>A. halleri</i> d'origine MET et N-MET pour les différents temps d'exposition aux concentrations en Cd et Zn en solution hydroponique .....	248

## Liste des abréviations et anagrammes utilisées

ACP : Analyse par Composantes Principales  
BCF : Facteur de Bioaccumulation  
CEC : Capacité d'Echange Cationique  
CL : Combinaison Linéaire  
C<sub>TOT</sub> : Carbone Total  
Cx/y : Concentration en Cd (x) et en Zn (y) dans une solution hydroponique  
DGT : Diffusive Gradients in Thin film  
DLU : Digital Light Units, unité arbitraire pour l'autoradiographie  
DRX : Diffraction Rayons X  
DW : Dry weigh  
EFF : pour « Efficacité », résidu qui équivaut à la somme des carrés des écarts entre spectre expérimental et spectre reconstruit  
ETM : Elément Trace Métallique  
EXAFS : Extended X-ray Absorption Fine Structure  
FM : Feuille Mature  
FJ : Feuille Jeune  
FW : Fresh Weigh  
GSH : Glutathion  
ICP-AES : Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry  
MEB-EDS : Microscopie Electronique à Balayage – Spectrométrie en Energie Dispersive  
MET : plante d'origine métallicole  
MO : Matière Organique  
MSE : Mis en Suspension dans de l'Eau  
N-MET : plante d'origine non-métallicole  
P + CV : Petiole + Central Vein  
PA : Plant Adaptation  
PC : Phytochélatine  
Periph Tissue : Peripheral Tissue  
PS : Poids Sec  
sm : start monitoring  
TF : Transformée de Fourier  
ti : temps initial, à la sortie du curage  
Trich : Trichomes  
VNF : Voies Navigables de France  
XANES : X-Ray Absorption Near Edge Structure  
μ-XRF : micro-Fluorescence à Rayon X



# **Introduction**



## INTRODUCTION

Le territoire français compte 525 000 km de cours d'eau (Fig. 0-1 ; Schneider, 2001). Le domaine Public Fluvial comprend environ 18000 km de voies d'eau dont 8500 km (47% du réseau total) considérées comme navigables. La répartition de la gestion de ces 8500 km de voies d'eau est la suivante :

- 6700 km confiés par l'Etat à VNF (Voies Navigables de France)
- 700 km gérés directement par l'Etat
- 1000 km transférés par décret à différentes régions.

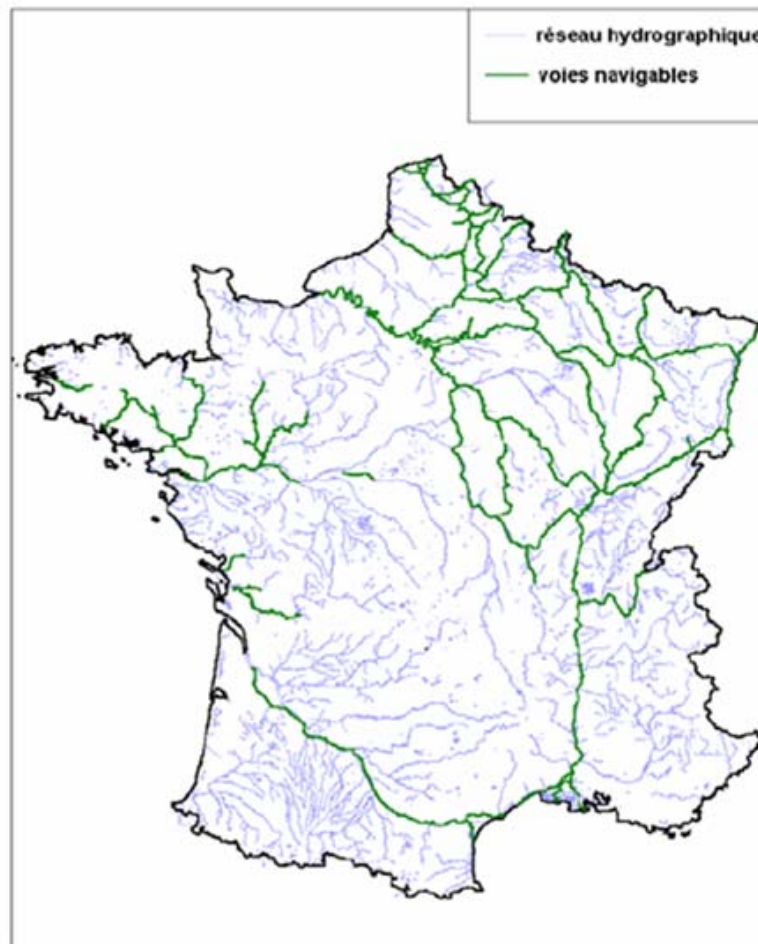


Figure 0-1 : Réseau hydrographique de la France comprenant le réseau navigable. Figure extraite du rapport intitulé « Historique National des opérations de curage et perspectives », Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, janvier 2002.

Le phénomène d'érosion des bassins versants, le drainage des terres agricoles et les rejets urbains ou industriels sont à l'origine d'un envasement continu des cours d'eau. Les dépôts ne sont pas uniformes sur l'ensemble des cours d'eau et autres canaux mais se concentrent dans les zones de faible courant permettant aux matières en suspension (MES) de décanter (Roche, 2001).

La sédimentation induit de multiples problèmes, dans différents domaines :

- hydraulique : la baisse de la capacité utile des ouvrages hydrauliques entraîne une perte de la maîtrise des crues et limite les volumes disponibles pour l'irrigation et les activités touristiques. Par ailleurs, les sédiments entravent l'écoulement et augmentent le risque d'inondation des terrains riverains, avec l'envasement progressif du lit (Romero, 1999).

- écologique : la dégradation des fonctions biologiques du cours d'eau, associée à une perte de la biodiversité conduit à une baisse de la qualité de l'eau. Par exemple, la perturbation des flux de matériaux provoque l'apparition de deltas en amont des retenues et prive l'aval, et ses écosystèmes, des matériaux nécessaires à la régénération des frayères, aux échanges chimiques et à la dégradation de la matière organique (Fontana, 1997).

- transport fluvial : la baisse de la hauteur d'eau disponible entrave la navigation (Romero, 1999).

De plus, l'attrait touristique et paysager est diminué.

La législation française (article L.215-15 du code de l'environnement et article 1 du code du domaine public de l'Etat) rend obligatoire leur curage régulier des voies d'eau afin de garantir leur maintien en bon état. Le curage constitue une opération de restauration, d'entretien voire d'assainissement indispensable à la prévention des risques d'inondation, au rétablissement du tirant d'eau pour la navigation, et aussi à la restauration du milieu naturel. En France, 9 millions de m<sup>3</sup> de sédiments sont curés chaque année (source VNF – journée nationale du sédiment, Lille - septembre 2007 ; Guide de dragage 2008, VNF).



Les sédiments curés sont potentiellement pollués par des rejets industriels et agricoles ainsi que des eaux urbaines par temps de pluie. La région Nord Pas-De-Calais marquée par son passé industriel lié à l'exploitation du charbon et à l'industrie métallurgique est une des régions dont les cours d'eau sont les plus affectés par ces problèmes de pollutions. En effet, ce sont 750 000 m<sup>3</sup> qui sont curés chaque année, dont un tiers sont considérés comme pollués (source VNF – journée nationale du sédiment, Lille - septembre 2007 ; Guide de dragage 2008, VNF). Les sédiments de curage peuvent être utilisés en régalage, incinérés ou confinés. Soixante-dix pourcent des sédiments sont mis sur berge ou mis en dépôt.

La pollution par les métaux est l'un des problèmes majeurs de ces sédiments. L'état des lieux des sites de dépôt de sédiment de curage recense dans la Région Nord Pas-de-Calais, 183 terrains de dépôt. Après curage, les sédiments au contact de l'air peuvent s'acidifier libérant ainsi les métaux en solution (Tiffreau et al., 1999). Leur capacité tampon diminue et ils deviennent plus perméables. Le flux d'eau qui percole à travers le sédiment s'accroît ce qui peut entraîner une augmentation du risque de contamination du sous-sol ou des nappes souterraines. Un sédiment sans végétation est soumis à l'érosion par le vent et les intempéries et constitue une source de contamination de l'environnement proche (Vangronsveld et al., 1995). La contamination des sédiments de curage par les métaux pose donc un problème environnemental certain. Certains anciens sites de dépôt n'étant pas sécurisés, la présence de contaminants métalliques multiples et l'absence de technologies efficaces et peu coûteuses pour traiter les sédiments pollués créent le besoin de développer des technologies innovantes de remédiation.

Parmi les méthodes explorées pour réhabiliter les sites de dépôts contaminés, la phytoremédiation fait partie des méthodes dites « douces ». La phytoremédiation (grec phyto : plante, latin remedium : corriger un méfait) consiste à utiliser les plantes vertes et leur microbiote associé pour extraire (phytoextraction), contenir ou immobiliser (phytostabilisation) les métaux dans un sol contaminé (Cunningham & Berti, 1995 ; Vangronsveld et al., 2009). C'est un système de méthodes non destructives de l'environnement qui s'adaptent à de vastes surfaces.

La phytoextraction est un procédé qui utilise des plantes capables de retirer des quantités significatives de métaux du substrat sur lequel elles se développent (Raskin &

Ensley, 2000). Les fortes concentrations dans les parties aériennes des plantes peuvent être dues aux propriétés physiologiques naturelles des plantes (hyperaccumulation). La phytoextraction peut être envisagée pour traiter les sites de dépôt de sédiments contaminés par les métaux même si cette approche en est seulement à ses débuts en Europe. L'état de l'art met clairement en évidence le faible nombre d'études qui concernent les sédiments de curage et l'impact des plantes sur ce type de matrice (Bert et al., 2009).

La phytostabilisation consiste à cultiver des plantes tolérantes mais non accumulatrices de métaux sur un milieu contaminé en présence d'amendements organiques ou minéraux. Le but est d'assurer un couvert végétal, et si possible de modifier la spéciation des métaux dans la matrice contaminée, en formant des phases plus stables grâce aux processus rhizosphériques. De nombreuses études ont évalué l'effet des plantes et de différents amendements sur la spéciation des métaux.

Selon Baker and Brooks (1989), une plante est dite hyperaccumulatrice à partir d'une concentration dépendant du métal : plus de 1000 mg/g de matière sèche dans les feuilles pour le nickel, plus de 10 000 mg/g pour le zinc par exemple. Dans la plante, les métaux vont se complexer avec des acides organiques ou des acides aminés synthétisés par la plante, selon le métal en question, mais ces mécanismes restent mal connus. Généralement, une grande partie du métal absorbé est transporté des racines vers les parties aériennes (tige et feuille).

*Arabidopsis halleri* est une des espèces hyperaccumulatrices de Cd connues à ce jour. A ce titre, *A. halleri* pourrait être une candidate en phytoextraction. Depuis quelques années, cette espèce est étudiée de manière intensive pour sa tolérance au Zn et au Cd et pour l'accumulation de ces métaux (ex : Macnair, 2002 ; Sarret et al., 2002 ; Bert et al., 2003 ; Cho et al., 2003 ; Becher et al., 2004 ; Weber et al., 2004). L'espèce développe des populations sur sols contaminés (populations métallicoles – MET) et non contaminés (populations non métallicoles – N-MET) par les métaux et accumule le Zn et le Cd de manière constitutive (Bert et al., 2000 ; 2002). La littérature met en évidence le manque de données concernant les mécanismes de l'accumulation et la forme chimique du Cd chez cette espèce.

Ce projet de thèse vise à mieux comprendre les mécanismes d'accumulation du Cd dans la plante hyperaccumulatrice *A. halleri* et l'impact de sa culture sur un sédiment de

curage contaminé par des éléments traces. Ce projet combine des approches physique, physico-chimique ou encore physiologique, et intègre des matrices variées (le sédiment, les lixiviats et la plante) et des échelles d'étude variées (la plante entière, l'organe, la cellule et les compartiments sub-cellulaires, ainsi que le sédiment et ses différentes fractions granulométriques à l'échelle globale, agrégats microscopiques et à l'échelle moléculaire). Il met en œuvre des outils variés et de pointe tels que les techniques sur synchrotron, l'autoradiographie et la chimie analytique. Ce projet de recherche s'articule autour des questions suivantes :

- Comment se comporte *A. halleri* sur un sédiment de curage contaminé ? Quel est l'impact d'*A. halleri* sur la biodisponibilité et la spéciation du Cd dans ce type de sédiment ?

- Où se distribue le Cd chez *A. halleri* et sous quelle forme chimique ? Quels sont les mécanismes de stockage du Cd dans la plante en précisant le rôle des différents ligands possibles tout en tenant compte de la compétition entre les différents polluants métalliques, en particulier le Zn qui est également hyperaccumulé par *A. halleri* ? Y a-t-il une différence entre les plantes d'origine métallicole et non métallicole et entre feuilles jeunes et matures ?

L'objectif finalisé de ce projet est d'accroître les connaissances concernant l'accumulation du Cd chez l'hyperaccumulateur *A. halleri*, pré-requis indispensable au transfert technologique de la phytoextraction.

Ce manuscrit se compose en 3 parties :

- Le premier chapitre est une étude bibliographique dans laquelle nous aborderons, dans un premier temps, la problématique de la pollution en éléments trace métalliques (ETM), en particulier le Cd, dans les sédiments ; puis dans un second temps celle liée à la gestion des sédiments de curage. Nous nous intéresserons, dans une troisième partie, au comportement du Cd dans les sédiments en terme de spéciation et mobilité/biodisponibilité et nous présenterons les différentes méthodes de déterminations associées. Dans une quatrième partie, nous présenterons les différents paramètres pouvant influencer l'évolution de la mobilité du Cd présent dans le sédiment après une culture de plante. Pour terminer cette synthèse bibliographique, nous ferons

l'état de l'art sur le Cd dans les plantes, et plus particulièrement sur l'accumulation, la localisation, la distribution et la spéciation de ce métal.

- Le second chapitre vise à étudier le système « plante/sédiment contaminé », l'objectif étant d'évaluer le transfert de Cd dans la plante et de préciser l'impact de la culture d'*A. halleri* sur le sédiment. Les différents aspects étudiés dans ce chapitre reposent sur une expérience de culture en pot d'*A. halleri* en conditions contrôlées. Après une description du dispositif expérimental, des échantillons et de la démarche analytique utilisée, nous présenterons dans un premier temps, les résultats des différents paramètres mesurés dans le cadre d'un suivi macroscopique de la plante et du sédiment au cours de la culture (e.g. paramètres de croissance de la plante, concentration en Cd dans les parties aériennes des plantes, dans le sédiment, dans les lixiviats, biodisponibilité du Cd...). Ensuite, nous présenterons les résultats sur la localisation et la spéciation du Cd dans le sédiment avant et après culture d'*A. halleri*.

- Le troisième et dernier chapitre vise à préciser les mécanismes de stockage du cadmium dans *A. halleri* à l'échelle macroscopique, microscopique et moléculaire. Dans une première partie, nous aborderons la localisation et la distribution du Cd au sein de la rosette et de la feuille, ainsi que la compétition avec le Zn qui est également hyperaccumulé par *A. halleri*. La deuxième partie traite de la spéciation du Cd dans les parties aériennes de *A. halleri* et les différents ligands possibles (acides organiques, acides aminés et phytochélatines).

# Chapitre I

## **Revue bibliographique**

# Sommaire

<b>CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1. POLLUTIONS DES SEDIMENTS.....</b>	<b>11</b>
I.1.1. DEFINITION ET PROBLEMATIQUES DES ELEMENTS TRACE METALLIQUES (ETM) DANS L'ENVIRONNEMENT .....	11
I.1.2. SOURCES D'ETM .....	13
I.1.2.1. L'industrie .....	13
I.1.2.2. L'agriculture .....	16
I.1.2.3. Les activités urbaines et domestiques.....	16
<b>I.2. GESTION DES SEDIMENTS EXTRAITS .....</b>	<b>18</b>
I.2.1. LA NOTION DE DECHET APPLIQUEE AUX SEDIMENTS .....	18
I.2.2. LE DEVENIR DES SEDIMENTS EXTRAITS .....	19
I.2.2.1. La valorisation : le réemploi des sédiments.....	19
I.2.2.2. La mise en décharge .....	20
I.2.2.3. Le dépôt ou le stockage.....	20
I.2.2.4. Le traitement des sédiments.....	22
I.2.3. TECHNIQUES DE PHYTOREMEDIATION POUR LA GESTION DES SEDIMENTS DE CURAGE. ....	24
I.2.3.1. Phytoremédiation : définition .....	24
I.2.3.2. La phytoextraction .....	25
<b>I.3. SPECIATION ET BIODISPONIBILITE DU Cd DANS LES SEDIMENTS .....</b>	<b>31</b>
I.3.1. CONCEPT DE SPECIATION ET BIODISPONIBILITE DANS LES SUBSTRATS .....	31
I.3.1.1. Biodisponibilité des ETM dans un substrat type sol-sédiment.....	31
I.3.1.2. Spéciation des ETM dans un substrat type sol-sédiment.....	32
I.3.2. MECANISMES DE FIXATION .....	32
I.3.3. CONSTITUANTS DU SEDIMENT : LES PHASES PORTEUSES DES METAUX ET LEUR REACTIVITE VIS-A-VIS DU CADMIUM .....	35
I.3.3.1. Les argiles .....	36
I.3.3.2. La matière organique (MO).....	36
I.3.3.3. Les oxyhydroxydes de fer et de manganèse .....	37
I.3.3.4. Les carbonates .....	39
I.3.3.5. Les sulfures .....	40
I.3.3.6. Les phosphates .....	41
I.3.4. METHODES POUR DETERMINER LA SPECIATION ET LA MOBILITE/BIODISPONIBILITE DU Cd DANS LE SEDIMENT .....	43
I.3.4.1. Méthodes chimiques pour évaluer la biodisponibilité .....	43
I.3.4.2. Méthodes biologiques.....	50
I.3.4.3. Méthodes physiques.....	52
<b>I.4. EVOLUTION DE LA MOBILITE DU Cd PRESENT DANS UN SEDIMENT DE MIS EN DEPOT ET APRES UNE CULTURE DE PLANTE .....</b>	<b>63</b>
I.4.1. IMPACT DE LA MISE EN DEPOT DE SEDIMENT .....	63
I.4.2. FACTEURS ABIOTIQUES INFLUENÇANT L'EVOLUTION DES ETM DANS LES SEDIMENTS .....	64
I.4.2.1. Potentiel d'oxydoréduction (Eh) et lessivage.....	65

I.4.2.2. Cycles de séchages humidifications .....	65
I.4.3. FACTEURS BIOTIQUES DE L'EVOLUTION DES ETM DES SEDIMENTS : EFFET DES PLANTES DANS LA RHIZOSPHERE .....	67
I.4.3.1. Influence des plantes sur le pH et potentiel d'oxydoréduction.....	67
I.4.3.2. Conséquences sur la spéciation des contaminants métalliques .....	71
 <b>I.5. Cd ET AUTRES METAUX DANS LES PLANTES, EN PARTICULIER LES HYPERACCUMULATRICES.....</b>	<b>73</b>
I.5.1. REPOSE DES PLANTES AUX ETM .....	73
I.5.2. TOLERANCE DES PLANTES AUX POLLUANTS METALLIQUES.....	74
I.5.3. L'HYPERACCUMULATION .....	75
I.5.4. MECANISMES DE TOLERANCE ET D'HYPERACCUMULATION.....	76
I.5.4.1. Les bases génétiques .....	76
I.5.4.2. Mécanismes d'hyperaccumulation.....	78
I.5.4.3. Méthodes pour étudier la localisation et la spéciation du Cd dans les plantes .....	79
I.5.4.4. Conséquences actuelles sur la localisation du Cd dans les plantes .....	81
I.5.4.5. Conséquences actuelles sur la spéciation du Cd dans les plantes .....	82
 <b>I.6. CONCLUSION BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>84</b>





# CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1. Pollutions des sédiments

Lors des dernières décennies, le phénomène d'envasement s'est amplifié en raison de l'accroissement des apports anthropiques et de l'érosion (dû notamment à des opérations de remembrement qui ont entraîné la destruction des haies et des talus). La contamination des sédiments a commencé à la fin du siècle dernier. Cette pollution est principalement due aux rejets industriels, urbains et agricoles. Les contaminants à l'origine de cette pollution sont généralement classés en trois grands groupes : les éléments nutritifs qui sont à l'origine de l'eutrophisation des milieux, les ETM et les micro-polluants organiques (hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP), pesticides, polychloro-biphényles (PCB), solvants chlorés...). D'autres polluants organiques des pesticides, des insecticides (le dichloro-diphényl-trichloroéthane (DDT) par exemple), et des médicaments peuvent également être présents dans les sédiments (Kelderman *et al.*, 2000; Diaz-Cruz *et al.*, 2003; Fung *et al.*, 2005).

### I.1.1. Définition et problématiques des éléments trace métalliques (ETM) dans l'environnement

Les ETM désignent les éléments ayant une densité supérieure à  $5\text{-}6 \text{ g cm}^{-3}$  (Alloway *et al.*, 1995), soit 53 sur 90 éléments présents naturellement. Mais parmi les ETM, les éléments métalliques dits « essentiels » sont à distinguer de ceux dits « non essentiels ». Les éléments métalliques essentiels ou oligoéléments (e.g., Zn, Mn, Cu, Ni) jouent un rôle prépondérant dans les fonctions physiologiques de la faune et la flore. Ils sont indispensables à faibles concentrations mais sont toxiques à fortes concentrations. Les éléments non essentiels (e.g., Cd, Pb, Hg), sont des éléments pour lesquels aucune fonction physiologique n'a été identifiée à ce jour, et toxiques à de très faibles concentrations.

Durant des siècles, les teneurs en métaux dans le milieu naturel ont peu varié, mais avec l'avènement de l'ère industrielle, les activités humaines sont devenues une nouvelle source d'émission de métaux, les concentrant dans l'air (Nriagu, 1989), l'eau (Stumm & Morgan, 1996) et les sols (Kabata-Pendias & Pendias, 1992; Alloway, 1995; Baize,

1997), et représentent un risque de contamination de la faune et la flore. Les sols et les sédiments constituent naturellement les réceptacles de tous les polluants métalliques (et organiques). Les métaux y sont plus ou moins fortement fixés sur les constituants (argiles, oxydes et hydroxydes (Fe, Mn, Al), matière organique). La toxicité des métaux dépend évidemment de leur teneur dans le milieu, mais surtout de leur spéciation, i.e. leur forme chimique, qui est elle-même conditionnée par les caractéristiques physico-chimiques et minéralogiques du milieu. En effet, c'est la spéciation qui gouverne la mobilité et la biodisponibilité d'un élément, c'est-à-dire « son aptitude à passer d'un compartiment quelconque du sol à un être vivant (bactérie, végétal, animal, homme) » (Baize, 1997). Les plantes sont considérées comme des réservoirs intermédiaires par lesquels les métaux sont transférés aux autres organismes (Adriano et al., 1986). Ce transfert est fonction de la localisation et de l'accumulation des métaux dans les tissus des végétaux consommés. Les autres voies d'exposition aux polluants sont l'inhalation et l'ingestion directe de particules de sols et/ou sédiments contaminés.

Les conséquences de l'accumulation des ETM chez l'homme sont variées et propres à chaque métal. Par exemple, le Hg est très neurotoxique, de même que le Pb (saturnisme en particulier). Le Ni est possiblement cancérigène pour l'homme : l'exposition chronique au Ni est un facteur de risque du cancer du poumon. De plus, le nickel est le plus allergisant de tous les métaux.

En ce qui concerne le Cd, les denrées alimentaires sont la principale source d'exposition à cet ETM pour la population des non-fumeurs. Le taux d'absorption de cadmium après exposition alimentaire chez l'homme est relativement faible (3-5 %), mais le cadmium est stocké dans les reins et le foie de l'homme, et sa demi vie biologique peut aller de 10 à 30 ans. Le cadmium est particulièrement toxique pour les reins et peut aussi provoquer une déminéralisation osseuse. Dans les années 1950, au Japon, une intoxication aiguë au Cd a donné une maladie des reins et des os, nommée « *itai-itai* » (qui signifie « j'ai mal, j'ai mal »). Le Centre international de recherche sur le cancer a classé, sur la base d'études de médecine du travail, le cadmium dans la catégorie Carcinogène humain (groupe I). Une dose de référence sanitaire pour le cadmium de 7 µg/kg de masse corporelle (m.c.) par semaine ou dose hebdomadaire tolérable provisoire (Provisional Tolerable Weekly Intake - PTWI) a été établie par le Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives - JECFA), et approuvée par le Comité scientifique de l'alimentation humaine

(Scientific Committee for Food - SCF) (rapport EFSA, 2009). Les concentrations en cadmium les plus élevées ont été détectées dans les denrées alimentaires suivantes : algues, poisson et fruits de mer, chocolat et aliments destinés à des régimes alimentaires spécifiques. Les groupes d'aliments qui contribuaient le plus à l'exposition alimentaire au cadmium, surtout du fait de leur forte consommation, étaient les céréales et les produits céréaliers, les légumes, les noix et les légumes secs, les féculents ou les pommes de terre, la viande et les produits à base de viande. L'exposition alimentaire moyenne des adultes en Europe approche ou dépasse légèrement la dose hebdomadaire tolérable de 2,5  $\mu\text{g/kg m.c}$  (rapport EFSA, 2009). Des sous-groupes tels que les végétariens, les enfants, les fumeurs et les personnes vivant dans des zones fortement contaminées peuvent voir cette dose hebdomadaire tolérable multipliée par deux.

### **I.1.2. Sources d'ETM**

Les ETM entrent dans la constitution des roches, ils sont donc présents à l'état naturel dans les sédiments. La concentration en ETM d'origine naturelle est définie comme étant le fond géochimique (Baize, 2000; Adler, 2001; Feix & Tremel-Schaub, 2005). Compte tenu de la grande diversité géologique de notre pays, le fond géochimique d'un sol naturel peut ainsi varier considérablement à l'échelle du territoire français (Miquel, 2001). Les teneurs moyennes en Cd varient entre 0,05 et 0,45  $\text{mg kg}^{-1}$  (Baize, 2000).

Le développement intensif de l'industrie, de l'agriculture et de l'urbanisation a conduit à des problèmes de pollution par les ETM. L'industrie et l'agriculture représentent les deux principales sources anthropiques d'ETM. Les activités urbaines et domestiques sont parfois d'importantes sources de diffusion des ETM.

#### **I.1.2.1. L'industrie**

L'industrie métallurgique des métaux non-ferreux a été largement développée et les sites en activité ou en friche sont bien souvent contaminés par les ETM. Les métaux exploités sont principalement présents dans le minerai sous forme de sulfures, tels que la sphalérite ( $\text{ZnS}$ ) et la galène ( $\text{PbS}$ ), qui contiennent en impureté de nombreux autres métaux (Cd, Cu, et Ag entre autres) et non métaux (principalement As). Cette exploitation a généré de grandes quantités de scories et de débris de creusets, souvent

encore très riches en métaux, qui étaient stockés à l'air libre et sans précautions, conduisant à une contamination directe du site. Plus de 30 minéraux métallifères ont été identifiés dans des remblais issus de l'activité métallurgique, parmi lesquels des sulfures (Zn, Pb, Cd, Fe, Cu), de la zincite ( $\text{ZnO}$ ), de la willémitte ( $\text{Zn}_2\text{SiO}_4$ ), ... (Thiry & Van Oort, 1999).

Entre 1970 et 1979, la consommation mondiale de Cd était comprise entre 12 et 15 milliers de tonnes et elle s'est accrue de 2% par an. En 1980, l'Europe était le premier producteur de Cd (6 200 tonnes par an), loin devant le Japon (2 200 tonnes) et les USA (1 900 tonnes) (Boisset et al., 1996).

C'est au cours de la première guerre mondiale, lors de la préparation du Zn très pur par voie électrolytique pour des usages militaires, que des quantités importantes de sous-produits contenant des concentrations élevées en Cd ont été disponibles et ont pu être exploitées. L'élaboration d'une tonne de Zn produit en moyenne 3 Kg de Cd pur, et il n'est toujours pas possible de produire actuellement du Zn sans produire de Cd. Les seuls minéraux connus dont la concentration en Cd est suffisante pour en permettre théoriquement l'extraction directe sont la greenockite ( $\text{CdS}$ ), un sulfure à environ 78 % de Cd, et l'octavite ( $\text{CdCO}_3$ ), un carbonate à environ 62 % de Cd.

Les principales utilisations du Cd ont concerné la fabrication d'alliages, la galvanisation, la soudure, la fabrication de pigments pour la coloration des plastiques, les stabilisateurs de PVC et des substances fluorescentes, ainsi que la fabrication de batterie (Tab. I-1). Outre ces principaux domaines d'utilisation, le Cd et ses composés sont également employés en faible quantité dans diverses applications de haut niveau technologique (e.g. depuis des années 1990, des panneaux Cd-tellure sont en développement pour concurrencer le silicium pour les installations de captage de l'énergie solaire). Le Cd est aussi utilisé dans les domaines de l'électronique et de la peinture.

Tableau I-1 : Principales utilisations industrielles du Cd et de ses composés dérivés.

Nature du composé de Cd	Propriétés	Usages
Sulfures de Cd	<ul style="list-style-type: none"> <li>- couleurs vives</li> <li>- tenue à haute température</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- pigments pour matières plastiques, verres et peintures</li> </ul>
Cd métal	<ul style="list-style-type: none"> <li>- résistance à la corrosion</li> <li>- potentiel électrique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- revêtement de surface</li> <li>- accumulateurs Ni-Cd</li> </ul>
Alliages métalliques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- faible température de fusion</li> <li>- bon conducteur électrique</li> <li>- résistance mécanique à l'arc électrique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- alliages de soudure</li> <li>- caténaires - cables</li> <li>- interrupteurs</li> </ul>
Savons (benzoate, octanoate, aurate...)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stabilité aux températures élevées</li> <li>- bon vieillissement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stabilisant pour matières plastiques</li> </ul>

Les retombées atmosphériques (émission de poussières riches en métaux issues des cheminées des fonderies, dispersion éolienne des scories,...) sont l'une des principales sources de contamination des sols et des sédiments environnant les fonderies (Sobanska, 1999; Buatier et al., 2001). Le ruissellement des eaux naturelles sur les déchets miniers ainsi que le transport des minerais par péniche ont contribué à la contamination des sédiments (Fajtl et al., 2002).

De nos jours les rejets dans l'environnement sont plus contrôlés, mais les pratiques passées ont rendu les abords des fonderies largement contaminés en métaux (O'day et al., 1998; Buatier et al., 2001; Isaure et al., 2002). Par exemple, dans le nord de la France, les retombées annuelles d'une usine de métaux non ferreux sur une zone de 10000 ha ont été estimées à 55 t de plomb, 44 t de zinc et 1.6 t de cadmium (Cambier & Mench, 1998). Il est courant d'observer des teneurs en métaux anormalement élevées dans un sédiment situé à proximité de fonderies, par exemple Berteau et al. (1993) et Isaure et al. (2001) ont mesuré des teneurs en Zn, Pb et Cd qui sont, respectivement, 90, 40 et 380 fois plus élevées que le fond géochimique régional (Tab. I-2).

Tableau I-2 : Impact de l'activité humaine sur la teneur en métaux dans les sédiments.

	Teneurs (mg.kg <sup>-1</sup> ) considérés comme naturelles dans les sédiments (1)	Exemple de teneurs (mg.kg <sup>-1</sup> ) de sédiments prélevés à proximité de fonderies (2)
Zn	75	6600
Pb	20	770
Cd	0,5	192

(1) Bécart et al. (1997). Teneurs pour la région Nord-Pas de Calais.

(2) Isaure (2001). Sédiments prélevés dans le canal de la Scarpe (59).

### I.1.2.2. L'agriculture

De nombreux fertilisants organiques et minéraux employés en agriculture contiennent des métaux (Tab. I-3). Par exemple, les fumiers sont connus pour contenir du Zn et du Cu (Alloway, 1995). Les boues urbaines issues du traitement des eaux usées contiennent du Zn, du Pb, du Cu, du Cr et du Cd. Les engrais à base de chaux peuvent être riches en Pb, et dans une moindre mesure en Zn, Cu et Cd. Une pratique courante consiste à épandre ces boues sur des surfaces agricoles. Les engrais phosphatés contiennent également ces métaux. Les pesticides et certains fongicides sont également riches en métaux tels que le Cu, l'As, le Hg, le Pb et le Zn.

Tableau I-3 : Teneurs en métaux dans les principaux fertilisants agricoles (en mg.kg<sup>-1</sup> de matière sèche) – Données issues de Alloway (1995).

	Fumures	Engrais phosphatés	Engrais à base de chaux
Cd	0.1 - 0.8	0.1 – 170	0.04 - 0.1
Cr	1.1 - 55	66 – 245	oct-15
Cu	2 - 172	1 – 300	2 - 125
Hg	0.01 - 0.36	0.01 - 1.2	0.05
Pb	1.1 - 27	7 – 225	20 - 1250
Zn	15 - 566	50 – 1450	10 - 450

### I.1.2.3. Les activités urbaines et domestiques

Les activités domestiques et urbaines sont aussi des sources anthropiques de contamination en ETM dont les modes de dispersion sont variés : fumées, égouts, voiture... Les retombées atmosphériques représentent une source importante d'enrichissement des sols en ETM au voisinage des fortes densités urbaines. Les fumées

de combustibles fossiles représentent l'une des principales sources de pollution de l'air en Cd. Les combustions d'huiles, de papiers, de déchets organiques urbains (i.e. incinération d'ordures ménagères), les décharges et les émissions automobiles. Les particules résultant de l'usure des pneus sont aussi une source d'accroissement des teneurs en Zn et Cd des sols et de la végétation situés en bordure d'axes routiers.

Les eaux de ruissellement urbaines (voiries/parking) ainsi que les rejets d'eaux usées jouent un rôle dans les flux de pollution arrivant dans les canaux car elles sont chargées en polluants tels que Cd, Zn, Cu. Les boues d'épuration urbaine épandues sur les champs ou en forêt sont des sources parfois importantes de métaux.

Les canaux, et autres cours d'eau servent souvent d'exutoire à de nombreux rejets. Une étude menée par Zebracki (2008) sur un tronçon du canal de la Scarpe (Douai – 59 – France) rapporte que les rejets arrivant dans cette partie du canal sont d'origine industrielle et, urbaine (station d'épuration, eau de ruissellement du réseau routier et station de relevage). Les stations de relevage récupèrent les eaux de ruissellement drainant les sols, les eaux de collecteurs urbains d'eau pluviale, le surplus d'eau dans les agglomérations, le trop plein des marais, et les eaux des petits cours d'eau. Dans la région Nord-Pas-de-Calais, 80 stations de relevage des eaux permettent aujourd'hui l'évacuation des eaux qui sinon s'accumuleraient dans les zones affaissées (Zebracki, 2008).

## **I.2. Gestions des sédiments extraits**

Pour l'entretien des 525 000 km de cours d'eau que compte le territoire français, 9 millions de m<sup>3</sup> de sédiments sont curés chaque année (source VNF – journée nationale du sédiment, Lille - septembre 2007). De plus, une partie de ces sédiments extraits présente des teneurs élevées en polluants. Rappelons que pour la région Nord Pas-de-Calais, ce sont 750 000 m<sup>3</sup> qui sont curés chaque année, dont un tiers sont considérés comme pollués (source VNF – journée nationale du sédiment, Lille - septembre 2007 ; Guide dragage 2008, VNF). La principale question qui se pose est très pragmatique : que faire des sédiments extraits ?

### **I.2.1. La notion de déchet appliquée aux sédiments**

Les sédiments extraits des cours d'eau sont des déchets. Ils peuvent être classifiés en 3 catégories : déchets inertes, déchets dangereux et déchets non-dangereux.

En 1998, en l'absence de réglementation spécifique, VNF a créé une circulaire technique dans laquelle figure une classification des matériaux de dragage en fonction de valeurs seuils de référence définies en interne. Ces seuils, considérés aujourd'hui comme obsolètes, ne permettaient pas d'identifier le risque que les matériaux extraits pouvaient représenter pour l'homme et l'environnement. Ainsi, pour combler cette carence en matière de risque de transfert vers l'homme et les écosystèmes, et au vu de la note juridique du MEDD du 18 septembre 2002 demandant une caractérisation de la dangerosité des sédiments selon le critère H14 « écotoxicologique », VNF a financé en 2001 et 2003 des études pour évaluer l'écotoxicité des matériaux de dragage. Ces études réalisées par le CEMAGREF et l'ENTPE ont permis de déterminer de nouveaux seuils de pollution des sédiments de dragage ainsi qu'un indice de contamination polymétallique, déterminé selon une approche écotoxicologique et statistique en fonction du niveau d'effet probable sur le milieu aquatique notamment, repris dans une nouvelle circulaire en 2004. La circulaire a été mise à jour en 2006. Le tableau I-4 présente de manière détaillée l'ensemble des seuils S1 définis dans l'arrêté du 9 août 2006 pour caractériser la qualité physico-chimique de ses sédiments. Selon les caractéristiques des sédiments, différentes filières sont envisageables pour la gestion des sédiments.



Tableau I-4 : Niveaux S1 relatifs aux éléments et composés traces, définis dans l'arrêté du 9 août 2006 (en mg/kg de sédiment sec analysé sur la fraction inférieure à 2 mm) – Extrait du Guide de dragage, 2008, VNF.

Paramètres	Niveau S1
Arsenic	30
Cadmium	2
Chrome	150
Cuivre	100
Mercure	1
Nickel	50
Plomb	100
Zinc	300
PCB totaux	0,680
HAP totaux	22,800

## **I.2.2. Le devenir des sédiments extraits**

Contrairement aux pratiques passées, de nos jours, des études spécifiques de caractérisation des sédiments sont menées afin de définir les devenirs possibles des sédiments extraits (Guide de Dragage 2008, VNF).

On distingue 4 grandes filières d'élimination des sédiments fluviaux : la valorisation, la mise en décharge, le stockage, et le traitement (Agostini, 2001, Kribi, 2003, Bortone et al., 2004).

### **I.2.2.1. La valorisation : le réemploi des sédiments**

Lorsque cela est possible et en fonction de leur nature granulométrique et de leur composition chimique, les sédiments peuvent être réutilisés:

- en génie civil : la confection de remblais, de digues, la création d'agrégats, la production de matériaux, de graviers, le remblaiement de carrière, l'aménagements paysagers, l'utilisation en technique routière ou encore l'incorporation à la confection de briques (Hamer & Karius, 2002 ; Dubois, 2006)
- en agriculture : l'épandage (Fig. I-1), la stabilisation et la fertilisation des sols en friche, ainsi que la régénération de terrains (Magdaliniuk et al., 2002).

### *Cas particulier de l'épandage*

Les sédiments (boues de curage) sont épandus sur des parcelles agricoles sur une épaisseur de 1 à 5 cm en fonction de la sensibilité des plantes cultivées (culture alimentaire dont pâturage ou production de bois) après épandage et du niveau de pollutions des sédiments.



Figure I-1 : Opération d'épandage sur un champ (Cliché de M. Rousselet, Cemagref – issu des courriers de l'INRA).

#### **I.2.2.2. La mise en décharge**

Les sédiments peuvent être déposés en centre d'enfouissement technique. Trois types de décharges ont été définies, qui reçoivent les déchets classés inertes, non dangereux et dangereux. Les critères d'admission se basent en grande partie sur les tests de lixiviations en batch avec un rapport liquide/solide de 10 l/kg et une granulométrie inférieure à 4 mm (norme NF EN 12457-2 (indice de classement X30-402-2)).

#### **I.2.2.3. Le dépôt ou le stockage**

- **Le régalage le long des berges** (Fig. I-2). Cette opération consiste à déposer les produits de curage en formant une bande de « terre » (5 à 10 m de large et de 10 à 30 cm d'épaisseur) le long des rives, avec des aménagements drainants, permettant l'écoulement des eaux de pluies (Magdaliniuk et al., 2002). Parfois les sédiments sont directement projetés sur la berge par un canon. Les sédiments sont régalés sur la servitude locale, ce qui permet d'effectuer le régalage sans nuisances pour l'agriculteur, et de faciliter l'accès au fossé.

- **La mise en dépôt non confiné** (Fig. I-2). Lorsqu'aucun débouché n'existe ou que la configuration du site ne permet pas de disposer d'espace sur berges, la mise en dépôt est envisagée. Le site de dépôt peut être un bassin creusé dans la terre sans étanchéité particulière, il doit se situer dans une zone non inondable, facile d'accès et proche du site à curer de manière à simplifier le transport des sédiments extraits. Une étude d'usage futur du site doit être effectuée en même temps que le plan de mise en dépôt. Les usages de ces sites peuvent être : la culture alimentaire et non alimentaire, l'aménagement et l'entretien d'une zone de loisir, réserves faunistiques et floristiques.

- **La mise en dépôt confiné.** Cette solution consiste à stocker les sédiments sur un site étanche et imperméable (couverture argileuse et géomembrane avec un système de drainage pour récupérer les lixiviats pollués). Après exploitation, les sites doivent être réaménagés (travaux paysagers) et soumis à contrôle.

- **La mise en dépôt sous eau (le clapage).** Les sédiments sont transportés et rejetés dans le milieu aquatique, dans une zone officiellement définie pour cet usage : soit une zone de grande profondeur, en aval du cours d'eau curé, soit en milieu marin. L'objectif visé est le stockage des sédiments sous une grande hauteur d'eau, ou leur dispersion dans le milieu naturel.

- **Dragage à l' « américaine ».** Les sédiments sont remis en suspension à l'aide d'une hélice à air comprimé, dans les cours d'eau ou les chenaux à fort courant. Ils sont repris dans le flux et se redéposent en aval.



Figure I-2 : Stockage et régalaage des sédiments fluviaux curés.

Après sa mise en dépôt, un sédiment sans végétation est soumis à l'érosion par le vent et les intempéries, et constitue une source de contamination de l'environnement proche (Vangronsveld et al., 1995). De plus, lors du ressuyage et du séchage du sédiment, un transfert des métaux vers le sol sous-jacent est possible (Isaure et al., 2002). La contamination des sédiments de curage par les métaux peut être à la source d'un problème environnemental.

#### **1.2.2.4. Le traitement des sédiments**

Les différentes possibilités de traitement sont :

- détruire les charges polluantes,
- extraire les charges polluantes,
- immobiliser ou neutraliser les charges polluantes.

Etant donné le surcoût occasionné par ces traitements, il semble raisonnable de penser qu'ils sont exclusivement dévoués aux sédiments présentant des niveaux de pollutions importants. Il est possible de distinguer :

- **le pré-traitement**, qui a pour but de réduire le volume des sédiments pour améliorer leur qualité ou faciliter un traitement ultérieur. Il s'effectue soit par déshydratation par filtre presse, centrifugation et tri granulométrique.

- **le traitement** : Il est difficile d'établir une liste exhaustive de tous les traitements existants pour différentes raisons : d'une part, ils sont très nombreux et parfois spécifiques à un seul type de sédiment et d'autre part, beaucoup sont en cours de développement et/ou évoluent continuellement. Classiquement, les différents traitements existants sont :

- **traitement biologique** : utilisation de micro-organismes pour dégrader et/ou extraire les micro-polluants organiques ou pour accélérer la décomposition naturelle des contaminants organiques,
- **traitement physico-chimique** : ces types de traitement s'appuient sur des interactions physico-chimiques telles que l'adsorption/désorption, oxydation/réduction, échange ionique... pour détruire, immobiliser ou transformer les substances indésirables,

- **traitement physique** : l'opération consiste à concentrer les polluants par des procédés physiques (centrifugation, pyrolyse, filtration ou hausse de pression), pour confiner les matières polluantes,
- **traitement thermique** : destruction des polluants organiques par chauffage. Elles utilisent de hautes températures (900-1 200°C) en présence d'oxygène afin de provoquer la combustion des polluants. L'incinération se fait dans les unités de traitement des ordures ménagères.

Les traitements des sédiments pollués par les ETM sont en réalité peu nombreux, coûteux et non développés à l'échelle industrielle.

De nos jours, de nouveaux procédés adaptés au sol peuvent être appliqués au sédiment (Procédé NOVOSOL®, procédé VBC 3000, Procédé Intissel). Par exemple, le procédé NOVOSOL® est un procédé de traitement développé par SOLVAY pour différents résidus minéraux contaminés : les sédiments de curage, mais aussi les boues industrielles, les sols contaminés, les cendres volantes d'incinération d'ordures ménagères et les résidus de broyage automobile. Le procédé est constitué de deux étapes distinctes non continues :

- une unité de phosphatation et déshydratation qui assure la stabilisation des ETM,
- une unité de calcination (> 450°C) qui détruit les composés organiques (HAP, PCB, dioxines, furannes...) par oxydation.

Au cours de ces dix dernières années, des techniques végétales pour le traitement des sédiments de curage se sont développées. La phytoremédiation est une technologie en émergence basée sur l'utilisation de plantes pour la dépollution ou la dégradation ou la décontamination de sites pollués par les métaux entre autres. Sous ce nom générique, la phytoremédiation se décline en phytostabilisation, phytoextraction et phytomining.

En conclusion, en France, à l'image des résultats obtenus pour l'année 2002, les principaux types de « devenir » identifiés sont la mise en dépôt et la remise en suspension (Fig. I-3-A). Cependant le type de devenir est lié aux maîtres d'ouvrages. Dans environ 60% des cas, VNF met en dépôt les sédiments (Fig. I-3-B). Il n'y a donc pas de filière de traitement mise en place. Bien que traités, dans la plupart des cas les sédiments ne peuvent être réutilisés, par conséquent les sédiments traités sont mis en

décharge. Il est alors plus simple et surtout moins coûteux de mettre directement les sédiments de curage en dépôt.

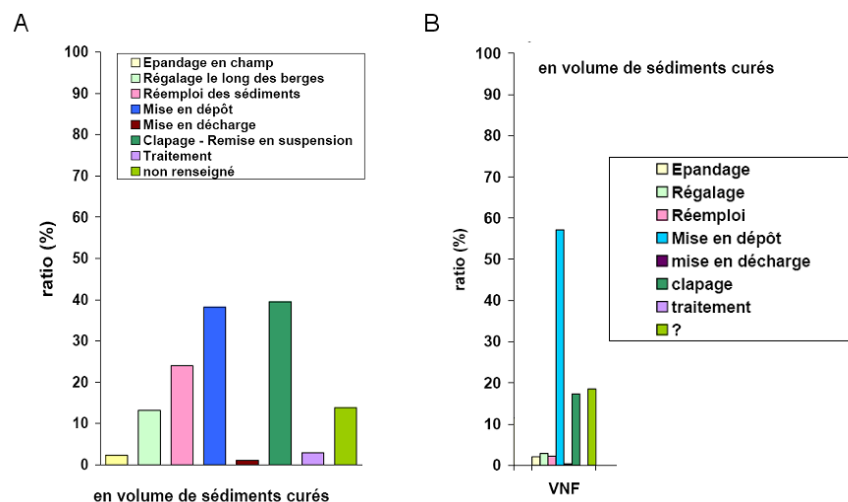


Figure I-3 : Devenir des sédiments curés à l'échelle nationale (A) et pour les cours d'eau gérés par VNF (B) pour l'année 2002 (source : historique national des opérations de curage et perspective, rapport 2002).

### I.2.3. Techniques de phytoremédiation pour la gestion des sédiments de curage.

#### I.2.3.1. Phytoremédiation : définition

La phytoremédiation, comme étant un nouveau traitement en cours de développement, est l'utilisation de végétaux supérieurs et de leurs micro-organismes associés, d'amendements et de techniques agricoles pour éliminer, contenir, ou rendre moins toxiques les contaminants environnementaux (Vangronsveld & Cunningham, 1998). Depuis quelques années cette approche est en plein essor et pourrait permettre de traiter les sols et les eaux contaminées par les métaux, les radioéléments (Dushenkov, 2003) et les polluants organiques (Van Der Lelie et al., 2001, Vassilev et al., 2004). Le terme générique de phytoremédiation regroupe deux stratégies de remédiation (e.g. Brooks, 1998; Bert & Deram, 1999 ; Raskin & Ensley, 2000; Bert et al., 2009; Vangronsveld et al., 2009) :

- **La phytostabilisation (ou phytorestauration)** permet de **réduire la mobilité des métaux** dans un sol contaminé et d'installer un couvert végétal.

- **La phytodécontamination** permet de **réduire la teneur des contaminants** présents dans le milieu ; elle regroupe plusieurs techniques selon le milieu à traiter et la nature des polluants :

- la phytoextraction : les métaux sont absorbés par les racines des plantes, transférés et accumulés dans les parties aériennes. Cette biomasse contaminée est ensuite fauchée et introduite dans une filière permettant sa valorisation ou son élimination classique.

- le phytomining : phytoextraction à but économique (par exemple pour le nickel (Chaney et al., 1999, 2005, 2007 ; Bani et al., 2007)).

- la phytodégradation : plantes et microflore associées transforment le polluant en substances moins toxiques (polluants organiques).

- la phytovolatilisation : élimination de contaminants volatiles du sol (arsenic, bore, mercure, sélénium) par évapotranspiration.

- la rhizofiltration : utilisation de plantes terrestres ou aquatiques capables de développer leur système racinaire dans des eaux polluées et d'y concentrer de grandes quantités de contaminants du fait de leur forte biomasse racinaire.

En France, il existe des entreprises qui mettent en œuvre des procédés de phytoremédiation comme PHYTOREM® ou Phytorestore®. Leur activité principale concerne le traitement des eaux, mais aussi, dans une moindre mesure, celui des matrices solides (boues, sols). Les procédés mis en œuvre font appel à la fois à la rhizofiltration, à la phytodégradation et à la phytostabilisation.

### **I.2.3.2. La phytoextraction**

Deux approches différentes ont donc été proposées :

- 1- Plusieurs auteurs ont proposé d'exploiter la capacité des plantes hyperaccumulatrices à accumuler de fortes concentrations en métaux sans montrer de signes de toxicité apparents (Baker et al., 1994; Raskin et al., 1997; McGrath et al., 1998). Cependant, la contrainte principale de ce type de phytoextraction est la biomasse généralement faible produite par ces plantes hyperaccumulatrices.

- 2- L'utilisation de plantes choisies pour leur capacité à produire de forte biomasse (lesquelles peuvent, parfois, accumuler aussi de grandes quantités d'ETM)

#### 1.2.3.2.1. Avantages et inconvénients de la phytoextraction

La phytoextraction du Ni et de l'Au semble être économiquement viable pour certains métaux (Ni : Bani et al., 2007 ; Chaney et al., 2007 ; Au : Harris et al., 2009). Dans ce cas favorable, on parle de phytomining. Il n'y a pas de filière de ce type pour le Cd et le Zn car leur valeur économique actuelle est trop faible.

La biomasse récoltée peut être utilisée afin de développer des sources d'énergie alternatives aux énergies fossiles. Par exemple, la matière ligneuse, le bois, constitue une source de bioénergie intéressante qui peut être utilisée soit directement par combustion ou, par suite de divers procédés, être transformée en éthanol ou en méthanol. Cette matière ligneuse peut provenir de résidus forestiers mais peut également être produite en cultivant des arbres à croissance rapide tels des saules, des peupliers, des aulnes selon les techniques de culture intensive sur courtes rotations (Schwitzguebel et al., 2002).

Cette technique est considérée par le public comme étant une technique "verte" préservant l'environnement (Susarla et al., 2002). C'est, une technique conduite *in situ* qui devrait produire peu de déchets si la biomasse produite est recyclée tant pour produire de l'énergie que pour l'extraction des métaux, et qui ne va pas altérer la structure et les fonctions du sol.

Cette technique comporte cependant des inconvénients:

- La phytoextraction est un processus lent en comparaison des méthodes de remédiation classiques (Susarla et al., 2002).
- La valorisation de la biomasse produite n'est pas toujours possible (Schroder et al., 2008).
- La zone traitée est limitée à la rhizosphère (Fig. I-4), les plantes ne sont capables d'extraire que la fraction phytodisponible (pool labile de métaux) et aucune plante n'est capable d'extraire tous les métaux.



- Même si ce procédé peut être rentable dans certains cas et pour des contaminations faibles, dans l'état actuel des connaissances, des infrastructures et des pratiques agricoles il ne l'est pas dans la majorité des cas de figure.

#### **PHYTOEXTRACTION**

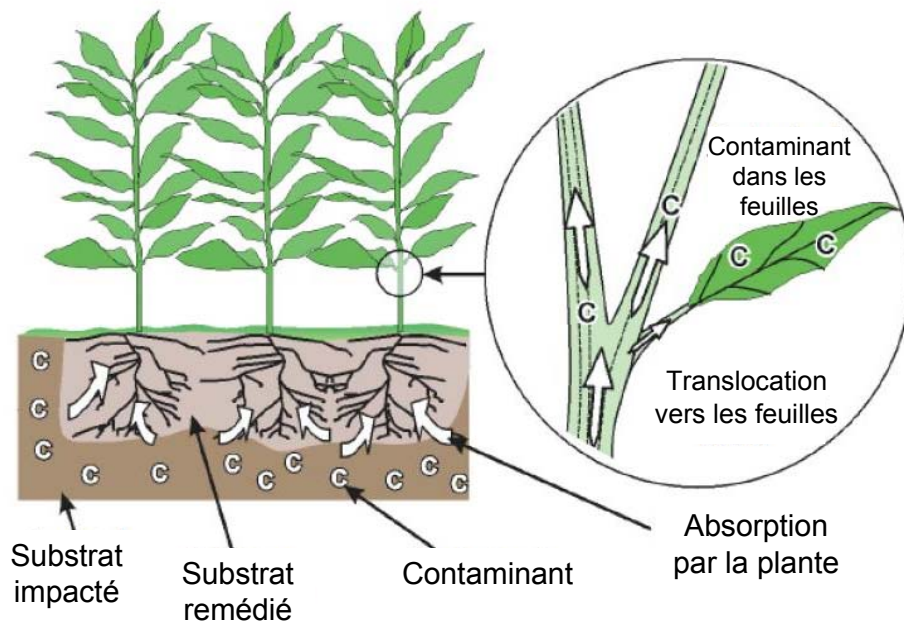


Figure I-4 : Principe de la phytoextraction. Ce schéma illustre l'assimilation des contaminants (C) contenus dans un substrat par les racines de la plante et le mouvement des contaminants des racines vers les parties aériennes de la plante.

#### 1.2.3.2.2. Voies de recherches

Comme cette technologie est encore essentiellement au stade de développement, de nombreux travaux de recherche sont encore nécessaires pour une optimisation. Des questions non résolues sont encore d'actualité en ce qui concerne la domestication d'espèces végétales et le développement de la filière (semences (sélection, production), itinéraires techniques, gestion de la biomasse, effets écotoxicologiques, machinisme, grande échelle, aspects économiques...). L'application de la phytoextraction est limitée à cause du manque de méthodes établies et de succès établis pour une complète remédiation dans les cas étudiés, du manque de performance économique reconnue et du risque de contamination de la chaîne alimentaire. La faisabilité et le succès de phytoextraction dépendent du degré de contamination métallique, les caractéristiques du

substrat (la fertilité, la biodisponibilité métallique, etc.) et la capacité de la plante pour résister aux concentrations de polluants fortement toxiques.

#### 1.2.3.2.3. Phytoextraction du Cd

##### Utilisation de plantes hyperaccumulatrices

Les plantes hyperaccumulatrices pseudo-métallophytes se trouvent sur des sites riches en métaux, mais également sur des sites non contaminés. C'est le cas d'*Arabidopsis halleri*, présente sur les sites contaminés du nord de la France et de plusieurs pays d'Europe (Belgique, Suisse, Pologne, Tchéquie, Allemagne, etc.), mais aussi en milieu montagnard en Europe de l'est (Pologne, Roumanie, etc...) (Pauwells et al., 2006).

Les teneurs en ETM dans les parties aériennes des hyperaccumulateurs sont au moins 100 fois plus élevées que celles trouvées dans les plantes non accumulatrices cultivées sur un même sol dans les mêmes conditions (Brooks et al., 1998). Selon Baker et Brooks (1989), le seuil appliqué pour définir l'hyperaccumulation du Cd est 100 mg Cd par kg de feuilles (poids sec). Des seuils ont également été définis pour d'autres métaux incluant Ni (1000 mg kg<sup>-1</sup>) et Zn (10 000 mg kg<sup>-1</sup>). Environ 400 taxons de plantes terrestres ont été identifiés comme des hyperaccumulateurs, les ¾ d'entre eux étant des hyperaccumulateurs de Ni (Baker and Brooks, 1989; Brooks et al., 1998). Il en reste probablement encore beaucoup à découvrir. Seulement deux hyperaccumulateurs de Cd, tous deux appartenant à la famille des Brassicaceae, ont été observés jusqu'à présent : *Arabidopsis halleri* et *Thlaspi caerulescens*. Elles ont été activement étudiées (Dahmani-Müller et al., 2000; Kupper et al., 2000 ; Lombi et al., 2000 ; Schwartz et al., 2001 ; Bert et al., 2000, 2002, 2003 ; Macnair et al., 2002 ; Sarret et al., 2002 ; Cho et al., 2003 ; Ernst et al., 2004 ; Cosio et al., 2005 ; Clemens et al., 2006 ; Craciun et al., 2006; Zhao et al., 2000, 2006 ; Roosens et al., 2008, Vangronsveld et al., 2009 ; Verbruggen et al., 2009 - liste non exhaustive).

Parce qu'elles ont développé des mécanismes physiologiques permettant l'accumulation et la tolérance de quantités létales de métaux pour les autres espèces, les plantes hyperaccumulatrices sont des organismes modèles scientifiquement très intéressants (Salt & Krämer, 2000; Assunção et al., 2003). L'inconvénient principal de ces plantes

pour une utilisation rentable en phytoextraction est leur faible production de biomasse, en particulier pour les hyperaccumulatrices de Cd.

Plusieurs chercheurs ont examiné les façons d'augmenter la production de biomasse des plantes hyperaccumulatrices. Brewer et al. (1999) ont rapporté les résultats de l'hybridation somatique de *T. caerulescens* avec *Brassica napus*, grande productrice de biomasse. Les hybrides obtenus étaient plus grands et ont produit plus de biomasse que *T. caerulescens*. Ils étaient capables d'accumuler Zn et Cd à des niveaux habituellement toxiques pour *B. napus*, mais au-dessous des niveaux généralement associés à l'hyperaccumulation (Brewer et al., 1999). Une autre possibilité envisagée est d'utiliser le génie génétique pour conférer les caractéristiques d'hyperaccumulation aux plantes développant une importante biomasse (Krämer & Chardonnens, 2001; Pilon-Smits & Pilon, 2002). Cependant, les mécanismes de base responsables de l'hyperaccumulation ne sont pas encore entièrement compris et ce manque d'informations limite l'application de cette technique d'ingénierie moléculaire. De plus, bien que le génie génétique soit une voie potentielle pour obtenir des plantes efficaces pour la phytoextraction, les recherches sur les OGM et leur utilisation sont toujours limitées dans beaucoup de pays notamment en Europe, et il existe de fortes oppositions aux OGM dans l'opinion publique. Une autre stratégie est de mieux utiliser la biodiversité existante, et éventuellement d'améliorer les capacités des hyperaccumulatrices par des croisements. Actuellement, la plupart des espèces hyperaccumulatrices candidates à la phytoextraction sont des espèces sauvages non commercialisées, et qui n'ont pas subi de processus de sélection comme les cultivars des plantes agricoles. Un travail de sélection sur les capacités d'accumulation et la production de biomasse pourrait permettre d'améliorer les rendements de phytoextraction.

#### Utilisation d'espèces à forte biomasse

Un paramètre critique pour évaluer l'efficacité de la phytoextraction est l'assimilation totale en métaux par hectare. Ce paramètre est calculé à partir de la concentration en métaux mesurées dans les parties récoltées et la production de biomasse (Ebbs et al., 1997; Meers et al., 2005). Les plantes qui emploient d'autres mécanismes que l'hyperaccumulation présentent des concentrations en métaux dans les parties aériennes généralement faibles, mais une plus importante biomasse (McGrath, 1998). Le tabac (*Nicotiana tabacum*), le tournesol (*Helianthus annuus*), la moutarde indienne (*Brassica*

*juncea*), le maïs (*Zea mays*), ... produisent de forts rendements et sont connus pour accumuler les ETM, mais les études associées ont été principalement réalisées avec des chélatants (Wenzel et al., 2003). La moutarde indienne a été jusqu'ici la plus étudiée de ces plantes en raison de sa réponse positive aux ETM et aux additifs comme EDTA (Bégonia et al., 1998). Des espèces d'arbres, particulièrement les espèces pionnières (le saule (*Salix*), le peuplier, ...), semblent également prometteuses pour la phytoextraction du Cd (e.g. Greger and Landberg, 1999 ; Pulford et Watson, 2003; Vervaeke et al., 2003 ; Meers et al., 2005, Vangronsveld et al., 2009).

### **I.3. Spéciation et biodisponibilité du Cd dans les sédiments**

#### **I.3.1. Concept de spéciation et biodisponibilité dans les substrats**

Un certain nombre de définitions de *biodisponibilité* et de *spéciation* sont disponibles dans la bibliographie. Ces définitions ont évolué avec le temps pour refléter au mieux la compréhension (toujours croissante) des mécanismes contrôlant les processus environnementaux.

##### **I.3.1.1. Biodisponibilité des ETM dans un substrat de type sol-sédiment**

Selon Vangronsveld *et al.* (2002), la *biodisponibilité* se réfère à une fraction de la quantité totale d'un contaminant du sol ou du sédiment disponible pour les organismes récepteurs ou pouvant interagir avec une cible biologique. Baize (2002) donne une autre définition : la *biodisponibilité* est la propriété d'une espèce chimique ou d'un élément présent dans le sol, d'être plus ou moins absorbé par les organismes vivants via la solution du sol. Un élément chimique est biodisponible, particulièrement pour les plantes terrestres, s'il est présent, ou peut être aisément transformé, sous la forme d'ion libre; s'il peut se déplacer vers les racines de la plante pour une échelle de temps adéquate à la croissance et le développement de la plante et être absorbé (Sposito, 1989 ; Nolan *et al.*, 2003). Lorsqu'il s'agit des plantes, on parlera de *phytobiodisponibilité*.

La *biodisponibilité* est déterminée par la combinaison de paramètres chimiques, biologiques et environnementaux (Peijnenburg & Jager, 2003). Il s'agit notamment de l'espèce choisie et des propriétés du sol (Feng *et al.*, 2005), comme le pH, des teneurs en matière organique, en argile et en oxyde de Fe, du potentiel d'oxydoréduction (Giller *et al.*, 1998), de l'origine des métaux (lithogénique ou anthropogénique), de la température et du régime hydrique (Kabata-Pendias, 2004), ainsi que de l'activité microbiologique (Mench, 1998). Sauvé *et al.* (2000) ont montré que les paramètres les plus importants pour prédire le coefficient de distribution ( $K_d$ ) d'un métal dans un sol étaient la teneur en matière organique du sol, la teneur totale en métal et le pH du sol. La composition du sol et les paramètres physico-chimiques influencent la spéciation des métaux. Il y a donc un lien fort entre spéciation, mobilité et biodisponibilité (Lamy *et al.*, 2002).

### **I.3.1.2. Spéciation des ETM dans un substrat de type sol ou sédiment**

La *spéciation* peut être définie comme (a) la distribution d'un élément donné ou d'un composé au sein de différentes espèces chimiques\* (Bourg, 1988), et (b) la distribution d'éléments parmi leurs diverses formes chimiques et physiques, et les états d'oxydation possibles. Ceci inclut leurs ions libres, complexes, des paires d'ions et chélatants dans la solution et leurs phases solides amorphes et cristallines – Le tout pouvant influencer la réactivité, la mobilité et la *biodisponibilité* des éléments (Parker *et al.*, 1995 ; Nolan *et al.*, 2003).

L'importance de la spéciation repose sur le fait que l'évaluation de la concentration totale n'est pas suffisante pour déterminer l'impact environnemental d'un métal, car la forme chimique des métaux affecte leur biodisponibilité et leur capacité de transfert vers les écosystèmes (Mertens *et al.*, 2001). Par exemple les métaux inclus dans des structures cristallines ne sont pas très disponibles pour les plantes et les organismes sauf si le minéral est altéré ou dissous (Calmano *et al.*, 1993). L'importance de la connaissance de la spéciation pour évaluer la toxicité potentielle d'une pollution métallique est illustrée par l'étude de Cotter-Howells & Thornton (1991) sur la plombémie des habitants d'une zone fortement contaminée par le plomb (environ 7000 mg/kg de Pb dans le sol, comparé à 70 mg/kg pour le fond géochimique local). Les auteurs ont expliqué cette observation par le fait que le plomb était présent dans le sol sous forme de pyromorphite (ou chloropyromorphite)  $(\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl})$ , un phosphate de plomb fortement insoluble ( $K_{\text{sp}}=10^{-84}$ , Nriagu, 1984).

### **I.3.2. Mécanismes de fixation**

Dans cette section, nous allons présenter les principaux mécanismes physico-chimiques responsables de la rétention sur les solides d'espèces chimiques en solution.

La Figure I-5 (d'après Manceau *et al.* 2002) illustre les principales interactions entre un atome (ou une molécule) et un solide. Les processus physico-chimiques à l'interface

---

\* Selon Templeton *et al.* (2000), une « espèce chimique » est définie comme étant une forme spécifique d'un élément définie selon sa composition isotopique, son état d'oxydation ou électronique et/ou son complexe ou sa structure moléculaire.

solide/liquide, qui peuvent permettre le piégeage des polluants métalliques, sont les suivants :

• **Adsorption** : phénomène de surface par lequel des atomes ou des molécules se fixent sur la surface solide d'un substrat selon divers processus. Certains minéraux, comme les argiles ou les zéolites, sont d'excellents adsorbants, grâce à leurs très grandes surfaces spécifiques. On appelle désorption la transformation inverse de l'adsorption, par laquelle les molécules ou les atomes adsorbés se détachent du substrat. On distingue deux types d'adsorption, selon les mécanismes mis en jeu :

o *Adsorption physique (ou physisorption)* : elle est attribuable à l'attraction électrostatique d'un soluté par une surface polarisée, afin de maintenir l'électroneutralité. Les énergies de liaisons mises en jeu sont relativement faibles, du type force de Van der Waals. Les atomes de métal ne sont pas directement en contact avec la surface des particules du sol, mais ils sont présents au sein d'une sphère de molécules d'eau enrobant les particules du sol, appelées couche d'hydratation. On nomme ce type d'interaction « complexe de sphère externe ». Plusieurs couches d'atomes ou de molécules peuvent se déposer de cette manière. L'adsorption physique est généralement facilement réversible (Manceau *et al.*, 2002). La quantité totale de sites de sphère externe (en équivalent de charge) par masse d'échantillon est appelée la C.E.C. (capacité d'échange cationique).

o *Adsorption chimique (ou chimisorption)* : dans ce cas, la molécule adhère à la surface par des liaisons ioniques ou covalentes. Cette liaison est spécifique, c'est-à-dire qu'elle n'est possible qu'entre éléments ayant une configuration électronique adaptée (Sigg *et al.*, 2000). On parle de complexation de surface lorsqu'un ion métallique réagit avec un groupement anionique qui fonctionne comme un ligand inorganique (comme OH<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) ; ainsi ces sites de surface forment des liaisons chimiques avec les ions en solution.

• **Précipitation** : Elle a lieu lorsque les sites d'adsorption spécifique sont saturés, et lorsque le produit des activités des espèces en solution dépasse même localement le produit de solubilité ( $K_s$ ).

$$K_s = (A)^x \cdot (B)^y \quad (\text{eq.1})$$

où (A) et (B) représentent les activités des espèces dans le liquide et x et y leurs stoechiométries respectives. On parle de précipitation homogène lorsque le précipité se forme seul, et hétérogène lorsqu'il se forme à la surface d'une phase préexistante.

Dans les sols et sédiments, c'est la précipitation hétérogène qui prédomine et il est fréquent que des composés se forment à la surface de minéraux en conditions de sous-saturation dans la solution, c'est-à-dire que les minéraux déplacent l'équilibre de précipitation (McLaughlin & Singh, 1999). Dans le milieu naturel, les métaux précipitent principalement sous forme d'hydroxydes, de carbonates, de phosphates et de sulfures.

La co-précipitation est définie par Sposito (1989) comme la précipitation simultanée de plusieurs éléments. Cela se produit lorsqu'une phase minérale précipite et incorpore un élément exogène dans sa structure cristalline, en remplacement d'un atome constitutif du minéral. La co-précipitation peut conduire à la formation d'un solide homogène (ou solution solide homogène), si la taille et la valence de l'élément substituant sont comparables à ceux de l'élément remplacé. Dans le cas contraire, un solide mixte constitué de plusieurs phases se forme.

- **Substitution dans le réseau cristallin** : Un atome peut se substituer à un autre dans le réseau cristallin; sa charge, son électronégativité et sa taille (rayon ionique) doivent alors être similaires. Généralement, la différence entre les rayons ioniques de l'élément substituant et substitué ne doit pas dépasser environ 15 %, et la charge ne doit pas différer de plus d'une unité (Alloway, 1995).

- **Inclusion (piégeage mécanique)** : Il s'agit d'impuretés piégées mécaniquement dans des pores non débouchant lors de la croissance des minéraux. Sobanska et al. (1999) ont trouvées des particules de Pb pur ( $< 5\mu\text{m}$ ) piégées dans les sols soumis aux poussières d'une fonderie pyrométallurgique de Pb.



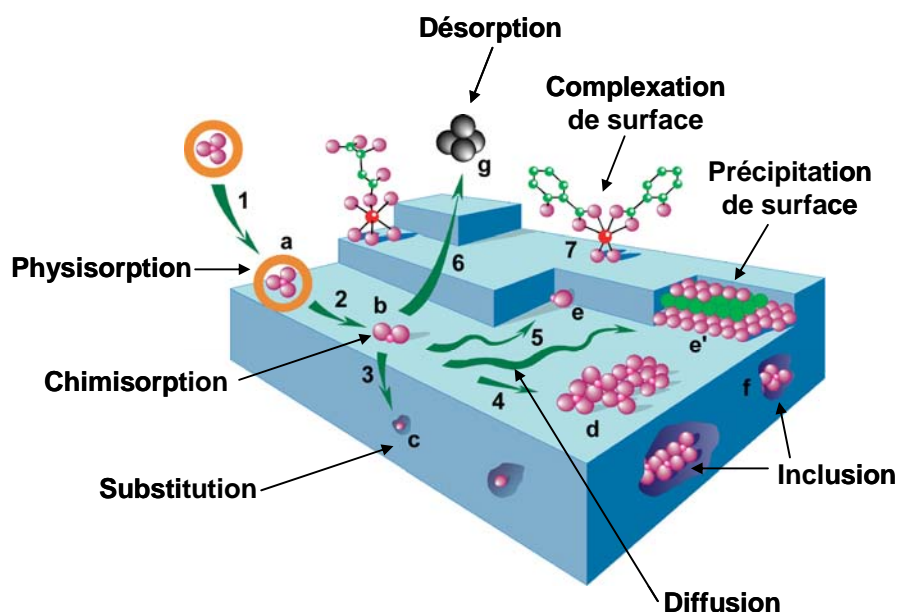


Figure I-5. Principales interactions entre un atome ou une molécule et un solide à l'interface solide/liquide (d'après Manceau *et al.* 2002). Adsorption (1) sous forme de complexe de sphère externe : physisorption (a) ; perte de la sphère d'hydratation (2) et formation d'un complexe de sphère interne : chimisorption (b) ; diffusion dans le réseau cristallin (3) et substitution isomorphique (c) ; diffusion latérale rapide (4,5) et formation d'un polymère de surface (d) ; adsorption sur un front de croissance du minéral (e et e') ; formation de polymère de surface et incorporation dans la matrice hôte après croissance cristalline (f). L'ion adsorbé peut éventuellement repasser en solution, suite par exemple à des réactions redox de surface ou d'un équilibre dynamique (g). (7) Complexation organo-minérale.

### I.3.3. Constituants du sédiment : les phases porteuses des métaux et leur réactivité vis-à-vis du cadmium

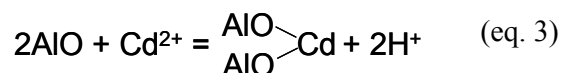
Le cadmium est un élément peu mobile. Dans la plupart des sols, plus de 99% du Cd contenu est associé à la phase solide (McLaughlin & Singh, 1999). Comme pour tous les ETM, le Cd est majoritairement présent dans la fraction fine, sous forme substituée ou adsorbée. La concentration en Cd étant généralement un à plusieurs ordres de grandeur inférieure à celle des autres cations comme  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , de forts effets de compétition sont à prévoir (Adriano *et al.*, 1986).

Etant donné que notre étude a consisté à mettre en culture un sédiment de dragage, cette revue bibliographique est focalisée sur la spéciation du cadmium en interaction avec les principales phases minérales et organiques des sols et des sédiments, à partir d'études sur des systèmes modèles et sur des systèmes naturels.

#### **I.3.3.1. Les argiles**

Il existe peu d'études sur les interactions du cadmium avec les argiles. Takamatsu et al. (2006) ont montré que Cd formait un complexe de sphère externe sur la montmorillonite à bas pH, et un précipité de surface de type  $\text{Cd}_5(\text{OH})_8(\text{NO}_3)_3 (\text{H}_2\text{O})_2$  à haut pH. Sajidu et al. (2008) ont étudié la sorption du cadmium sur une argile naturelle du Malawi. Ils ont montré que le métal était adsorbé en surface des feuillets en coordinence octaédrique, mais n'ont pas conclu sur la nature du complexe (sphère interne ou externe).

Des matériaux faiblement cristallisés ou microcristallisés tels que les allophanes, l'imogolite et les hydroxydes d'Al présentent aussi une capacité remarquable pour l'adsorption des ions  $\text{Cd}^{2+}$  (McLaughlin & Singh, 1999). L'adsorption spécifique du Cd sur les sites réactifs des oxydes métalliques et des aluminosilicates amorphes résulte de l'affinité du Cd pour l'O qui est assez forte pour libérer des  $\text{H}^+$  des groupes OH à la surface du métal :



#### **I.3.3.2. La matière organique (MO)**

Tous les composés organiques naturels simples ou complexes sont susceptibles d'être rencontrés dans les sédiments. En général, la proportion de matière organique dans les sédiments est de l'ordre de 2 à 10 % (Tack et al., 1996, 1999 ; Isaure, 2001). La composition de la matière organique est souvent proche d'un sédiment à l'autre, excepté en cas de contamination (en Hydrocarbure Aromatique Polycyclique, par exemple) (<http://www.eau-artois-picardie.fr>).

La décomposition de la MO suivie de la formation des substances humiques est très lente (plusieurs centaines d'années). Ces molécules possèdent à la fois de très fortes propriétés tensioactives et de fortes propriétés complexantes. Leur rôle est de ce fait prépondérant

dans les interactions organo-minérales qui existent dans les sédiments. On distingue des constituants de nature bien définie, hérités des plantes et des animaux du milieu ou biosynthétisés par la microflore, et des constituants plus complexes, comme les substances humiques.

La matière organique joue un rôle très important dans la constitution des phases secondaires des sédiments, puisque c'est le moteur principal de la diagenèse précoce. Elle peut également influencer sur le comportement des polluants métalliques en modifiant les propriétés de sorption des minéraux (formation de colloïdes) et en complexant fortement certains cations comme le cuivre (Alloway, 1995) ou le cadmium (Hoss et al., 2001).

Il existe une grande affinité entre la matière organique et les polluants métalliques (Lin et al., 1998). Coquery & Welbourn (1995) ont montré que l'affinité des substances humiques naturelles vis-à-vis des cations métalliques suit cet ordre :  $Hg > Cu > Pb > Zn > Cd > Fe$ . Par ailleurs, Adriano et al. (2001) ont montré que l'ordre général de l'affinité de complexation des métaux par la matière organique suit l'ordre :  $Cu > Cd > Fe > Pb > Ni > Co > Mn > Zn$ . Ces études montrent qu'il n'y a pas de règle générale régissant l'affinité des métaux par rapport à la matière organique. Cela dépend probablement de la composition du sédiment et des conditions physico-chimiques.

Les éléments sont retenus par la matière organique sous forme échangeable, ou à l'état de complexes dans lesquelles ils sont fixés plus fortement (Alloway, 1995). Taylor & Theng (1995) ont rapporté qu'en ajoutant des acides humiques dans les sols, la biodisponibilité du Cd est réduite. Les groupements réactifs majoritaires sont les groupements hydroxyl et, phénol pour l'humus et les groupements hydroxyl et carboxyl pour les acides humiques et fulviques. La matière organique contient également une faible proportion de groupements thiols. Le cadmium est connu pour sa forte affinité pour ces groupements. Karlsson et al. (2007) ont montré que ce métal était complexé par un mélange de groupements thiols et carboxyls, les premiers ayant une affinité supérieure pour Cd

#### **I.3.3.3. Les oxyhydroxydes de fer**

Ils se forment par précipitation et se trouvent dans la fraction fine ( $< 2\mu m$ ) agglomérés aux argiles, et en nodules concentriques dont le diamètre varie de quelques  $\mu m$  à environ

1 mm (Alloway, 1995; Manceau et al., 2003). La formation de nodules est très fréquente dans les sédiments marins (Post, 1999). Du fait de leur grande abondance dans la lithosphère et leur faible solubilité dans la gamme de pH des sols, l'aluminium, le fer et le manganèse forment les plus importants oxydes, oxyhydroxydes et hydroxydes dans le sol (Sposito, 1984). Les oxydes de fer et manganèse amorphes des sédiments sont les premiers intervenants dans les processus d'adsorption. Dans la majorité des sols, les oxyhydroxydes de fer et de manganèse représentent une phase de rétention privilégiée pour de nombreux cations métalliques comme le Cd (Sappin, 1995). La fraction liée aux oxydes constitue une réserve minérale potentiellement mobilisable, importante dans les équilibres chimiques entre les différentes phases porteuses des métaux dans les sols (Giroux, 2005).

La zone oxique contient majoritairement des hydroxydes mal cristallisés tels que la ferrihydrite ( $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), et dans une moindre mesure de la goethite ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) et de l'hématite ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Dans un sol la ferrihydrite évolue vers des composés mieux cristallisés comme la goethite et l'hématite, alors que dans les sédiments la présence de matière organique et les conditions réductrices inhibent souvent la formation ces phases (Schwertmann et Taylor, 1989). La ferrihydrite, qui est plus réactive que la goethite, adsorbe les métaux dans l'ordre  $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Cd}$  et la goethite dans l'ordre  $\text{Cu} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Cd}$  (Stephens et al., 2001).

Le Cd peut aussi être associé à des oxydes de fer bien cristallisés par adsorption spécifique (Manceau and Charlet, 1992) et à des oxydes de fer mal cristallisés comme la ferrihydrite (Spadini et al., 1994). Spadini et al. (1994) rapportent que les ions  $\text{Cd}^{2+}$  peuvent co-précipiter avec la goethite et l'hématite (Spadini et al., 1994). De goethite substituée par Cd a également été identifiée par Huynh et al. (2003). Le Cd peut également s'adsorber sur la goethite via des liaisons bidentates avec les atomes d'oxygène adjacents aux atomes de Fe (Collins et al., 1999).

En présence de phosphates, sulfates et humates, cette sorption est favorisée par des mécanismes électrostatiques (Collins et al., 1999). Une compétition pour l'adsorption sur de la goethite a été observé entre le Cd et le Zn (Bäckström *et al.*, 2003). En présence de Zn et de Pb, Carroll et al. (1998) ont observé que la sorption du Cd est réduite, ceci peut s'expliquer par une plus faible affinité du Cd pour les oxydes de fer par rapport à celle du Pb et du Zn (McLaughlin & Singh, 1999). Il existe donc un phénomène de compétition pour la sorption du Cd vis-à-vis des autres cations divalents

(souvent présents en excès par rapport au Cd). De nombreuses études traitent des aspects thermodynamiques et cinétiques de l'adsorption, en utilisant différents modèles (isotherme de Freundlich par exemple).

#### **I.3.3.4. Les carbonates**

Le terme carbonate fait référence le plus souvent aux carbonates de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) : calcite, vaterite et aragonite, mais aussi à la dolomite ( $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$ ). Les carbonates jouent un rôle important dans les sédiments, leur équilibre de dissolution contrôle partiellement le pH et une teneur élevée en carbonates rend le sédiment alcalin, favorisant ainsi l'ensemble des modes de fixations. De plus, la surface des carbonates est le siège de phénomène de sorption des ions métalliques : précipitation, adsorption (accumulation de la matière entre les phases solides et liquides, diffusion à l'intérieur de la phase solide) (Kribi, 2005).

Les carbonates de calcium peuvent contrôler la spéciation du Cd dans des sols alcalins (i.e. pour un pH compris entre 7.2 et 9). McBride et al (1994) ont aussi observé que les ions  $\text{Cd}^{2+}$  sont adsorbés à la surface des carbonates. Cette réaction est considérée comme un processus de chimisorption plutôt qu'une précipitation (McLaughlin & Singh, 1999). En revanche, Zachara et al. (1991), Reeder et al (1996 ; 1999) et Papadopoulos & Rowel (1988) suggèrent que le Cd est incorporé dans la structure cristalline de la calcite ou forme une solution solide de  $(\text{Cd,Ca})\text{CO}_3$  par croissance cristalline à partir de la calcite. Ce phénomène est favorisé par le fait que les rayons ioniques de  $\text{Cd}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  sont proches (0.97 Å et 0.99 Å respectivement). Carroll et al. (1998) et O'Day et al. (1998) suggèrent que la substitution de Cd dans la calcite se produit dans des sédiments pollués relativement pauvres en fer (<10 % en masse).

A très forte concentration en Cd, il peut se produire une précipitation de  $\text{CdCO}_3$  (Bailey et al., 2005).

Une étude menée sur différents sols calcaires du Haut Jura montre que le Cd se localise principalement au sein des phases carbonatées par substitution de Ca, mais il est aussi adsorbé sur les argiles et les oxyhydroxydes, et, complexé ou incorporé à la matière organique (Dubois et al., 2002).

### I.3.3.5. Les sulfures

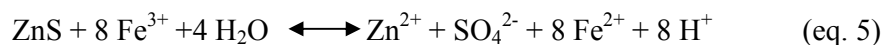
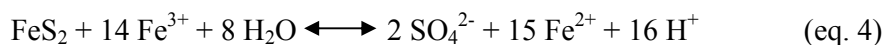
Le soufre existe dans les milieux naturels sous différentes formes organiques et inorganiques, et sous différents degrés d'oxydation allant de -II à VI. Les formes inorganiques solides les plus fréquentes incluent les sulfures métalliques tels que  $\text{FeS}^{\text{II}}$ ,  $\text{CdS}^{\text{II}}$ ,  $\text{ZnS}^{\text{II}}$  et  $\text{FeS}^{\text{I}}$ , le soufre élémentaire ( $\text{S}^0$ ) et les sulfates ( $\text{S}^{\text{VI}}\text{O}_4^{2-}$ ), ( $\text{S}$ ). Les formes organiques solides incluent les sulfures (thiols, mono et polysulfures et thiophènes,  $\text{S}^{\text{II}}$ ), les sulfoxides ( $\text{S}^{\text{II}}$ ), les sulfones ( $\text{S}^{\text{IV}}$ ), les acides sulfoniques ( $\text{S}^{\text{V}}$ ) et les sulfates ( $\text{S}^{\text{VI}}$ ).

Dans un sédiment en conditions anaérobie, l'essentiel du S se trouve sous forme de sulfure inorganique. La formation de ces sulfures de fer passe tout d'abord par la formation de mono-sulfures de fer, principalement de la mackinawite ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$ ) et de la greigite ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$ ), qui évoluent ensuite en pyrite et en marcasite (polymorphes de  $\text{FeS}_2$ ). Toutefois, si le milieu n'est pas assez riche en  $\text{HS}_2$  et en  $\text{HS}^-$ , ces mono-sulfures peuvent demeurer dans le milieu pendant une longue période (Berner, 1981). Les mono-sulfures métalliques sont désignés sous le terme « Acid Volatile Sulfide » (AVS). Les AVS les plus représentés sont les mono-sulfures de fer, mais on trouve aussi de l'alabandite ( $\text{Mn}^{\text{II}}\text{S}$ ) et d'autres associations métaux-S (Huerta-Diaz & Morse, 1992; Zhuang et al., 1994; Christensen, 1998).

La plupart des sulfures métalliques sont fortement insolubles même dans les milieux très acides (Tack et al., 1998). Par contre, dans un sédiment aéré (conditions oxydantes), ils s'oxydent en sulfates et oxyhydroxydes métalliques.

Dans les sédiments contaminés, le Cd et d'autres métaux comme le Zn, se trouvent généralement sous forme de sulfures (Kersten & Förstner, 1986; Zhuang et al., 1994; Carroll et al., 1998; Cauwenberg et al., 1998; O'day et al., 2000; Davis et Atkins, 2001; Fajtl et al., 2002; Isaure et al., 2002; Osan et al., 2002; Maes et al., 2003; Neuhausler et al., 2003). Pour des sédiments se trouvant aux abords de fonderies, Isaure et al. (2002) ont montré que les sulfures métalliques présents sont essentiellement d'origine anthropique et proviennent des scories. Ils peuvent aussi provenir des cendres volantes et des résidus de minerai et peuvent demeurer en l'état dans la partie anoxique des sédiments. Une caractérisation de sédiments en place aux abords d'un site minier a montré que la contamination provenait de particules de minerais (sphalérite ( $\text{ZnS}$ ) riche en cadmium, et galène ( $\text{PbS}$ ) - O'day et al., 1998). Les auteurs ont mis en évidence une différence de comportement géochimique pour ces éléments. Le cadmium est resté uniquement sous forme de sulfure, alors qu'une partie de la sphalérite s'est altérée en

oxyhydroxyde-Fe-Zn (par oxydation de la surface des particules de sphalérite, phénomène également rapporté par Davis et al. (2001), et Isaure et al. (2002)), et la totalité de la galène s'est oxydée. Dans le cas de contaminations urbaines et industrielles pour lesquelles les métaux ne sont pas rejetés sous forme de sulfures, c'est pourtant ces formes soufrées que l'on retrouve majoritairement dans les sédiments (Calmano & Wellershaus, 1982; Kersten & Förstner, 1986; Christensen, 1998). O'day et al. (2000) ont montré que dans un sédiment côtier, la totalité du cadmium se trouvait sous forme de mono-sulfures peu cristallisés. Ainsi, les conditions physico-chimiques particulières qui prévalent durant la formation des sédiments (diagenèse précoce) peuvent aboutir à la formation de sulfures métalliques, et ainsi séquestrer efficacement les métaux en milieu anoxique pour un sédiment pas trop riche en Fe (Di Toro et al., 1990; Zhuang et al., 1994; Benner et al., 1999). En effet, un excès d'ions  $\text{Fe}^{3+}$  peut favoriser la dissolution de sulfures tels que la pyrite et la sphalérite selon les réactions (4) et (5), et conduire à la remobilisation des métaux dans la colonne d'eau (O'Day et al., 2000).



Une étude de Bostik et al., (2000) rapporte que le Cd peut parfois s'adsorber sur la pyrite. Les métaux peuvent également se trouver en inclusion dans la pyrite par co-précipitation lors de la diagenèse précoce (Davis & Atkins, 2001), toutefois ce phénomène apparaît limité pour le zinc, le plomb et le cadmium (Huerta-Diaz et Morse, 1992). En effet, Morse & Luther III (1999) ont montré qu'en milieu anoxique, le Cd forme des sulfures métalliques fortement insolubles et cela avant la formation de  $\text{FeS}$ , ce qui limite son adsorption ou sa co-précipitation avec la pyrite.

#### **1.3.3.6. Les phosphates**

Les sédiments contiennent des phosphates organiques et inorganiques. La décomposition de la matière organique par les micro-organismes libère des phosphates qui peuvent précipiter dans la zone oxic sous forme d'apatites (francolite  $(\text{Ca}, \text{Na}, \text{Mg})_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ , dallite  $(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2)$ , hydroxylapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ ) ou être adsorbés sur les oxyhydroxydes de fer et d'aluminium et sur les argiles (Van Cappellen et Berner, 1991; Sondergaard et al., 2001). Dans la zone anoxique, la solubilité des

phosphates est contrôlée par la strengite ( $\text{FePO}_4$ ) et la vivianite ( $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)(\text{H}_2\text{O})_8$ ) (Berner, 1981; Lindsay et al., 1989; De Rooij et Gerrits, 1995; Sondergaard et al., 2001). Les divers phosphates sont capables de piéger les éléments métalliques par adsorption, substitution ou précipitation. Ces phénomènes ont été étudiés en conditions expérimentales essentiellement pour l'hydroxylapatite (Bigi et al., 1986 ; Middelburg and Comans, 1991 ; McGrellis et al., 2001 ; da Rocha et al., 2002). Le cadmium se retrouve fréquemment séquestré dans la structure cristalline des apatites naturelles en substitution de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sery et al., 1996). Ma et al. (1994) montrent que les substitutions isomorphiques sont fréquentes. Ils proposent la formule suivante pour l'hydroxylapatite :  $\text{N}_{10}(\text{RO}_4)_6\text{Y}_2$ , avec, par exemple N :  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $(\text{RO}_4) : \text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  et  $\text{Y}=\text{OH}^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ .

La réaction de précipitation entre les phosphates notamment l'hydroxylapatite et les ions  $\text{Cd}^{2+}$  entraîne une immobilisation efficace du métal du fait du caractère très peu soluble de ce minéral. Cette réaction régit notamment l'un des procédés utilisés pour le traitement de sols et sédiments (Novosol®) afin de stabiliser les métaux (Me) en les piégeant dans des phosphates calciques. En effet, lorsque les phosphates sont en excès et que le pH n'est pas trop bas ( $>3$ ), le Cd précipite rapidement sous la forme d'un phosphate de Cd très insoluble (Ayati & Madsen, 2000). Ce principe d'inertage est connu depuis longtemps et la stabilité chimique et thermique des composés formés a été mise en évidence par plusieurs études (Laperche et al., 1996, Crannell et al., 2000, Bournonville et al., 2004).

Panfili et al. (2005) ont suivi l'évolution de la spéciation du Zn d'un sédiment de curage induite par deux ans de phytostabilisation végétalisée ou non par des graminées, et avec ou sans amendement : scories Thomas (TAS) ou hydroxylapatite (TAP). Dans les mésocosmes amendés et non-végétalisés (TAP et TAS), une partie de la sphalerite, phase initialement majoritaire, a été éliminée au profit d'une association zinc-phosphate (Fig. I-6). Les auteurs ont aussi observé que l'oxydation de ZnS est plus rapide en présence de plante qu'en présence d'amendement seul (scories Thomas ou hydroxylapatite – Fig. I-6).



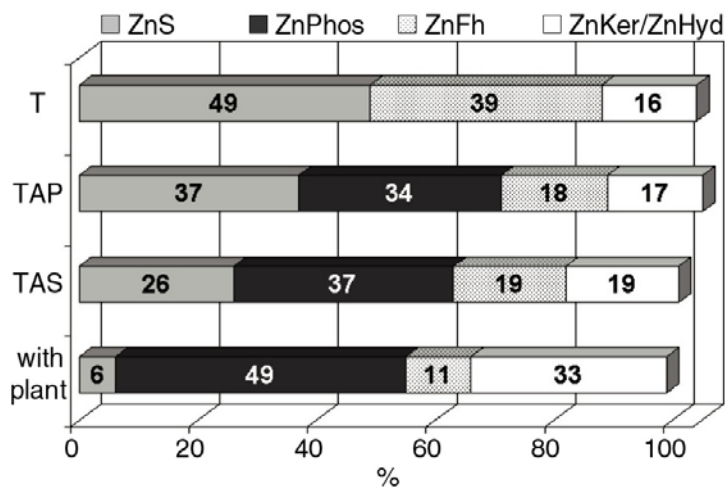


Figure I-6: Proportions des espèces zincifères dans l'ensemble des échantillons de sédiment de curage soumis à la phytostabilisation par des plantes (*with plant*), avec amendement (TAS : Scories Thomas, TAP : hydroxylapatite) et de sédiment sans plante ni amendement (T). Les espèces zincifères mises en présence sont : ZnS (sphalérite), Zn-phos (Zn-phosphates), ZnFh (Zn-ferrihydrite), ZnKer (Zn-Kérolite) et Zn-Hyd (Zn-Hydrocalcite). D'après Panfili et al., 2005.

#### I.3.4. Méthodes pour déterminer la spéciation et la mobilité/biodisponibilité du Cd dans le sédiment

On peut distinguer deux grands types de méthodes pour appréhender la biodisponibilité et la spéciation des ETM dans les sols: les méthodes physiques (ou directes) et les méthodes chimiques (ou indirectes). Dans le cas des méthodes physiques, la spéciation de l'élément considéré est abordée directement, à partir de moyens analytiques non destructifs au sens où la structure contenant ou sorbant l'élément n'est pas modifiée.

Dans les paragraphes suivants, nous nous proposons de dresser la liste des différentes méthodes en développant plus particulièrement les techniques utilisées au cours de cette thèse.

##### I.3.4.1. Méthodes chimiques pour évaluer la biodisponibilité

Dans le cas des méthodes chimiques, l'élément est sorti de son contexte structural par attaques chimiques et son analyse est indirecte dans la mesure où elle est réalisée dans la solution. Parmi ces méthodes chimiques, nous détaillerons les extractions chimiques, qui bien que controversées, restent une méthode simple de mise en oeuvre. Elles sont,

par ailleurs, les plus couramment utilisées. La plupart des méthodes exposées par la suite ont été utilisées pour étudier la spéciation des ETM dans les sols pollués et ont rarement été mises en oeuvre dans des contextes de sols naturels. Dans nos travaux, le pool en métaux échangeables a été déterminé par extraction chimique au  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  et le pool en métaux phytodisponibles par l'utilisation de DGT.

#### 1.3.4.1.1. Extractions chimiques : pool échangeable et phytodisponible

La fraction échangeable, désigne la fraction mobile, ou autrement dit labile, liée à une rétention de faible énergie sur le complexe d'échange, elle peut être extraite par de l'acétate d'ammonium 1 N à pH 7 (Giroux, 2005), ou à pH 5,2 (Greger & Landberg, 1999), avec  $\text{KNO}_3$  (0,5 M, 16 h) et  $\text{H}_2\text{O}$  (Amir et al., 2005), par du  $\text{CaCl}_2$  (Perronnet et al., 2000, 2003), par  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (McLaughlin *et al.*, 2000 ; Conder *et al.*, 2001 ; Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, 2003) et  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  (Mench et al., 1994 ; Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, 2003).

Les teneurs totales sont plus faciles à obtenir analytiquement et moins contestables concernant l'interprétation, que celles des extractions sélectives avec tel ou tel réactif (Baize, 2000). Différents problèmes ont été identifiés concernant les extractions séquentielles : manque de sélectivité, influence du protocole mis en place, réadsorption et précipitation incontrôlées, dissolution d'autres phases que celles ciblées, préparation des échantillons (Förstner and Kersten, 1988; Nirel & Morel, 1990; Bermond, 2002; Vangronsveld *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Les extractions séquentielles ne doivent par conséquent pas utiliser indistinctement un protocole existant et des procédures de validation doivent être mises en place (Nirel & Morel, 1990).

Lebourg *et al.* (1996) ont passé en revue 20 ans de recherche comparant les résultats d'extractions à l'assimilation du Cd, Cr, Cu, Pb, Ni et Zn par les plantes et ont conclu que les extractions réalisées avec des solutions de sels non-tamponnées étaient la façon la plus appropriée d'évaluer le potentiel de transfert de ces éléments du sol vers la plante. .

Dans le cadre de l'étude d'une pollution de sols agricoles à proximité d'une fonderie de Cu et Ni en Finlande, l'extraction par du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) n'est pas sélective (Kaasalainen & Yli-Halla, 2003). Le pool extrait, théoriquement lié à la matière organique, ne correspond pratiquement pas à ce pool. Les résultats des extractions séquentielles permettent d'identifier la contamination en métaux de sol ainsi que les mouvements verticaux possibles des métaux (Kaasalainen & Yli-Halla, 2003). A défaut, les extractions chimiques restent pertinentes dans le cas d'études comparées (Dorioz *et al.*, 1998).

La fraction liée à la matière organique a un impact sur l'activité biologique des sols, via l'alimentation carbonée des organismes du sol et la fonctionnalité du cycle biogéochimique (Giroux, 2005). Elle peut être évaluée par du pyrophosphate de potassium (Giroux, 2005). Pour les extractions à l'EDTA, le pouvoir complexant de fonctions amines mime la solubilisation biologique réalisée autour des racines par les exsudats racinaires (effet rhizosphère) (Legros *et al.*, 2002). Les extractions au DTPA sont plus adaptées aux sols calcaires car étant tamponnées à pH 7,3, les carbonates ne sont pas dissous (Feng *et al.*, 2005). Les complexants organiques solubilisent la fraction échangeable ainsi que les métaux complexés par la matière organique et les hydroxydes du sol (Lebourg *et al.*, 1996).

Une autre approche consiste à étudier la cinétique d'extraction des éléments à partir du sédiment ou du sol, à l'aide d'un seul réactif d'extraction, en vue de classer les métaux extraits en une fraction labile et une fraction non labile (Bermond, 1999). Cette méthode permet, par application des modèles cinétiques, de donner une meilleure compréhension de la labilité relative des complexes métalliques se trouvant dans la phase solide des sédiments ou des sols (Manouchehri, 2006). Les réactifs les plus utilisés dans les fractionnements cinétiques sont les acides et les agents complexant comme l'EDTA (éthylène diamine tétra acétate) et le NTA (acide nitrilotriacétique), le citrate, le chlorure d'ammonium et le nitrate d'ammonium (Krishnamurti *et al.*, 1999). Dans la chimie des sols, l'EDTA a été utilisé à plusieurs reprises dans la littérature, dans la dépollution de sites contaminés (Davis & Singh, 1995 ; Zeng *et al.*, 2004), dans la procédure d'extraction séquentielle normalisée établie par le Programme de Tests et Mesures Standards (Quevauviller *et al.*, 1998), comme modèle de ligands naturels

pouvant expliquer le transfert des ETM de la solution du sol aux plantes (Bermond *et al.*, 2005; Manouchehri, 2006).

Ces approches chimiques sont utilisées pour répondre à différents types de questions. Par exemple, certains auteurs les utilisent dans le but de localiser un élément dans un substrat. En effet, la localisation du Cd dans les phases les plus mobiles de sols près d'une fonderie en Finlande (Kaasalainen & Yli-Halla, 2003), et dans les sédiments d'un bassin de rétention autoroutier (Lee *et al.*, 1997) ont été ainsi mises en évidence par des extractions séquentielles (Clozel *et al.*, 2006).

L'objectif des extractions chimiques peut également être la prévision des risques de transferts vers les végétaux, c'est-à-dire d'évaluer la phytodisponibilité (Edwards *et al.*, 1998; Vangronsveld *et al.*, 2002). Dans ce cas, le pool de métal le plus disponible (extraction avec  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , ou  $\text{CaCl}_2$ , ou  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ou plus simplement à l'eau) semble mieux représenter le risque de transfert des métaux que les teneurs totales ou les extractions avec des extractants plus forts (EDTA). C'est ainsi le cas en ce qui concerne le Cu pour *Silene vulgaris* et *Elsholtzia splendens* (Song *et al.*, 2004). Pour *Lolium perenne* L. et *Lactuca sativa* L. cultivés sur 13 sols échantillonnés en Suisse, les concentrations dans les parties aériennes en Cu, Zn et Cd sont également mieux corrélés aux extractions avec  $\text{CaCl}_2$  0,05 M et  $\text{NaNO}_3$  0,1 M qu'à des extractants plus forts (Aten & Gupta, 1996). Une extraction avec  $\text{CaCl}_2$  0,01 M permet par ailleurs une bonne évaluation du pool disponible de Cd afin de modéliser son prélèvement par *Zea mais* L. et *Thlaspi caerulescens* (Sterckeman *et al.*, 2004). De même une extraction avec  $\text{CaCl}_2$  0,01 M à 90°C, permet de prévoir les teneurs en Zn, Cd, Ni et Mo mesurées dans *Trifolium pratense* cultivé sur deux sols amendés avec des boues urbaines ayant subies différents traitements (Mc Bride *et al.*, 2004). La comparaison des mesures du pool disponible en métaux, par différents extractants, dans différents sols végétalisés par *Triticum aestivum* L., a permis de valider l'utilisation d'extractants à base d'acides organiques de faible poids moléculaire, mimant les exsudats racinaires, par rapport aux extractants classiques tels que le DTPA, à l'EDTA, au  $\text{CaCl}_2$  et à  $\text{NaNO}_3$  (Feng *et al.*, 2005).

Une extraction au  $\text{CaCl}_2$  peut par ailleurs être utilisée afin de prédire la concentration de la solution du sol en Cd et Zn (Degryse *et al.*, 2003) ou la sensibilité microbienne au Zn

(Lock & Janssen, 2005). La mobilité et la biodisponibilité sont également évaluées par des extractions avec  $\text{MgCl}_2$  0,5M à pH 7 (Ullrich *et al.*, 1999).

#### 1.3.4.1.2. L'échange isotopique

Les cinétiques d'échanges isotopiques consistent à introduire dans un système sol-solution un isotope radioactif de l'élément étudié et lorsque la condition stationnaire est atteint, à mesurer les concentrations en élément stable et radioactif dans la phase solide et dans la solution et à déterminer le pool d'élément échangeable (Echevarria *et al.*, 1998; Sappin-Didier *et al.*, 2002). On suppose que l'élément radioactif s'échange de la même façon que l'élément stable.

Initialement mise au point par Fardeau *et al.* (1981; 1991) afin d'évaluer le P assimilable cette méthode a été adaptée par Echevarria *et al.* (1998) pour le Ni et par Smolders *et al.* (1999) pour le Cd.

Cette méthode n'introduit pas d'extractant chimique, elle perturbe donc peu les équilibres par rapport aux extractions séquentielles (Bolan *et al.*, 2003). Le principal problème est la nécessité d'utiliser des radio-isotopes et donc de disposer des équipements adéquats. Elle permet néanmoins la discrimination des processus impliqués dans la disponibilité (e.g. réaction de surface, diffusion...).

#### 1.3.4.1.3. Le gradient de diffusion en couche mince : utilisation des DGT

##### Principe

La technique du gradient diffusif sur film fin (« Diffusive Gradients in Thin film » : DGT) a été récemment développée (Zhang & Davison, 1995). Elle est fondée sur la mesure *in situ* d'un flux de métal dissous, et a été utilisée aussi bien dans la colonne d'eau que dans les sédiments ou les sols. Appliquée aux sols, cette méthode permet de quantifier la disponibilité physicochimique vis-à-vis des végétaux. En effet, ainsi que va le faire une racine, la DGT prélève des métaux présents en solution, induisant ainsi une déplétion et une réalimentation par la phase solide. L'avantage de la DGT est que le dispositif de prélèvement qui induit une modification des équilibres est capable simultanément d'en enregistrer les conséquences. La DGT prélève non seulement les ions libres mais également des espèces labiles, tels que certains complexes métal-ligand organique (Scally *et al.*, 2006).

Le dispositif d'un DGT est composé d'un support plastique, sur lequel sont disposés successivement une phase fixante (résine Chelex), un hydrogel de diffusion et un gel de polycarbonate (Figure I-7). Il permet l'extraction et la concentration *in situ* des métaux dissous "labiles".

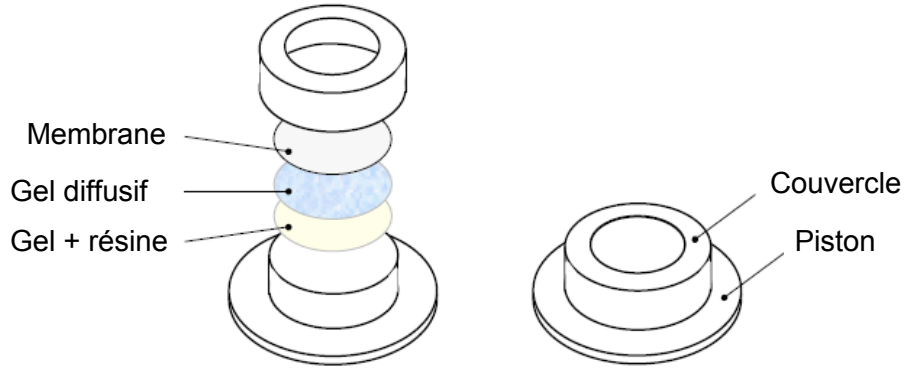


Figure I-7 : Schéma de montage d'un dispositif DGT

Une couche de résine chélatante (Chelex-100®) d'épaisseur  $\Delta r$  est séparée de l'échantillon par une couche de gel perméable d'épaisseur  $\Delta g$  (cf. figure I-8) et de taille de pores définie. Après un temps d'exposition, le système est retiré et le métal fixé sur la résine est élué (acide fort) puis sa concentration totale est mesurée par ICP-MS, ICP-AES ou AAS. Cette accumulation d'ions métallique dans la résine se produit de façon linéaire et quantitative au cours du temps. Le flux d'ions métalliques qui traversent par diffusion la couche de gel vers la résine est traduit par :

$$F = DC_{DGT} / \Delta g \quad (\text{eq. 4})$$

où  $D$  représente le coefficient de diffusion dans le gel,  $C_{DGT}$  la concentration en ion métallique à l'interface entre le dispositif et le sol.

Le flux  $F$  est déterminé directement à partir de la mesure de la masse de métal ( $M$ ) accumulé sur la résine de surface ( $A$ ) au bout d'un temps ( $t$ ), soit :

$$F = M / (At) \quad (\text{eq. 5})$$

En combinant et arrangeant les équations 4 et 5, on obtient :

$$C_{DGT} = \frac{M\Delta g}{DtA} \quad (\text{eq. 6})$$

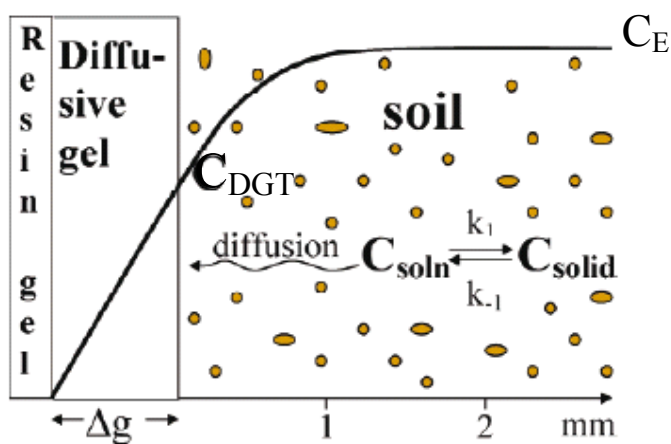


Figure I-8 : Représentation schématique du gradient de concentration en élément à l'interface entre le dispositif DGT et le sol. Le système est en équilibre dynamique, c'est à dire que la concentration à l'interface du DGT ( $C_{DGT}$ ) est maintenue constante par diffusion de l'élément et par réapprovisionnement à partir de la phase solide. La concentration  $C_E$  est la concentration en élément mobilisable dans le sol (Schéma adapté Ernstberger et al., 2005).

On peut ensuite remonter à la concentration  $C_E$  qui correspond à la concentration d'élément mobilisable dans le bulk (la masse) en faisant des hypothèses sur les phénomène de diffusion dans le sol. Cependant, de nombreuses études discutent de la valeur mesurée expérimentalement  $C_{DGT}$ .

De nombreuses études ont comparé les résultats obtenus par DGT avec la quantités accumulées par les végétaux afin d'évaluer si ce dispositif peut être utilisé pour prédire le prélèvement des métaux par les plantes. De bonnes corrélations ont été observées pour le cuivre dans *Lepidium heterophyllum* ( $R^2 = 0.95$  - Zhang et al., 2001) ou pour le zinc *Lepidium sativum* ( $R^2 = 0.93$  - Zhang et al., 2004) et le blé dur ( $R^2 = 0.96$  - Nolan et al., 2005). Cornu & Denaix (2006) ont testé ce dispositif sur des sols agricoles modérément contaminés de Mortagne du Nord, en utilisant la laitue comme modèle végétal. Une bonne corrélation a été observée pour le Zn et dans une moindre mesure pour le Cd (respectivement  $R^2 = 0.96$  et  $R^2 = 0.50$  - Fig. I-9). Almås et al. (2006) ont montré que les DGT fournissent une bonne prédiction de la biodisponibilité de Zn et Cd dans les ray-grass seulement à concentrations non-toxiques dans la solution de sol ( $R^2 = 0.96$  ;  $P < 0.001$ ).

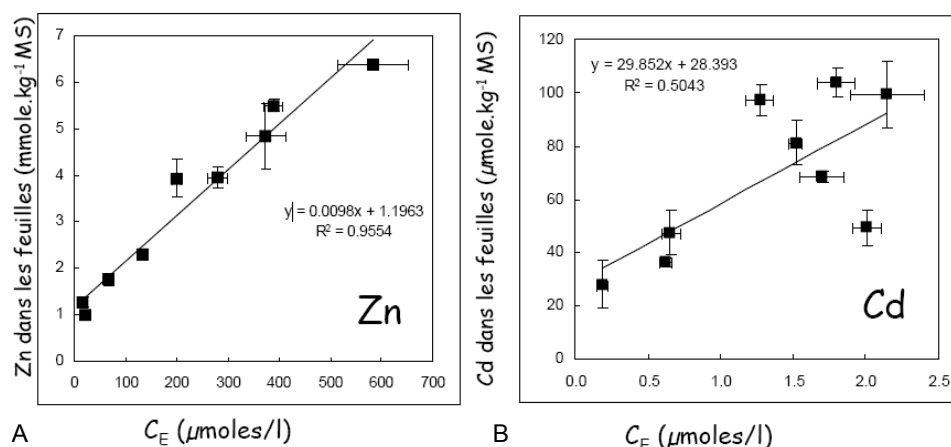


Figure I-9 : Relation de proportionnalité entre l'indicateur  $C_E$  et la concentration en Zn (A) et en Cd (B) dans les feuilles de la laitue cultivées sur sol contaminé de Mortagne du Nord affichant des concentrations totales en Zn oscillant entre 103 et 360 mg kg<sup>-1</sup> et entre 0.9 et 2.9 mg kg<sup>-1</sup> pour le Cd (données extraites de Cornu & Denaix, 2006)

Les hypothèses de base permettant l'application des DGT pour prédire et modéliser la phytodisponibilité semblent être les suivantes :

- On admet qu'il y a un facteur de proportionnalité entre la surface absorbante du végétal (surface racinaire active) et la surface du dispositif DGT.
- Les espèces labiles prélevées par la DGT sont celles qui participent à l'alimentation de la racine.
- Il n'y a pas de phytotoxicité.

#### I.3.4.2. Méthodes biologiques

Les analyses chimiques permettent d'estimer de façon indirecte la biodisponibilité d'un élément. Ce paramètre peut aussi se mesurer de façon directe via un essai avec l'organisme concerné (Giller *et al.*, 1998), d'autant plus que la sensibilité aux toxiques des plantes et des animaux est variable (Keddy *et al.*, 1995; Beltrami *et al.*, 1999). Les organismes vivants rendent compte non seulement de la biodisponibilité du polluant considéré mais aussi des conditions de culture et des autres nutriments. La toxicité est le résultat de tous ces facteurs. Les bio-essais sont donc plus adaptés que les analyses chimiques pour l'étude de la toxicité (Keddy *et al.*, 1995).

La biodisponibilité d'un élément peut alors être évaluée par sa teneur dans les végétaux ayant poussé sur le substrat considéré. Par exemple, une culture de *Lactuca sativa* est



utilisée par Schwartz *et al.* (2003) afin d'évaluer la disponibilité du Cd après un essai de phytoextraction par *Thlaspi caerulescens*.

Le RHIZOtest est un test biologique pour améliorer l'évaluation de l'exposition aux métaux des plantes cultivées en sols contaminés. Mais c'est aussi une mesure de biodisponibilité car les racines et les parties aériennes sont analysées. Le principe de ce test est basé sur une séparation physique du sol et des racines des plantes à l'aide d'une toile d'un diamètre de pore inférieur au diamètre des racines, ce qui permet un accès plus aisé et propre aux racines des plantes comparé aux cultures de plantes en pot. Cette technique est intéressante vis-à-vis de la récolte du système racinaire et de son adaptation à la plupart des plantes annuelles. La géométrie simplifiée du RHIZOtest permet la détermination du flux de prélèvement des métaux par la plante dans le sol en lien avec le risque de contamination de la chaîne alimentaire. Des travaux de validation du test ont été menés par Bravin *et al.* (2008) pour l'exposition au Cu de différentes plantes cultivées (blé, colza) sur sols à antécédent viticole du Languedoc-Roussillon. Ces derniers montrent que le test est sensible aux mêmes propriétés du sol que les plantes directement cultivées en champ, contrairement à différents tests chimiques généralement employés dans les procédures d'évaluation des risques.

La biodisponibilité d'un élément peut aussi être évaluée à l'aide de biocapteurs. Un biocapteur est constitué d'un détecteur d'origine biologique: enzyme, anticorps, récepteur... et d'un transducteur chargé de convertir le signal biologique en un signal aisément exploitable (généralement électrique ou lumineux). Les biocapteurs les plus utilisés pour les matrices contaminées sont des cellules microbiennes génétiquement modifiées par l'introduction du gène d'une protéine luminescente, le plus souvent la GFP (green fluorescent protein) au sein d'un opéron de résistance à un métal. Par exemple, Tauriainen *et al.* (1998) et Ivask *et al.*, (2002) ont utilisé des bactéries modifiées génétiquement pour devenir luminescentes en présence de Pb et Cd. Des biocapteurs ont aussi été développés pour d'autres polluants métalliques (Chaudri *et al.*, 2000 ; Tandy *et al.*, 2006). Ces biocapteurs sont utilisés sur une solution du sol et non sur le sol total, car le signal de luminescence est masqué ou réabsorbé par les particules si on travaille sur du sol en suspension.

A l'inverse, il existe aussi un autre type de biocapteur bactérien où la réduction de la bioluminescence est le reflet de la présence de métal dans le milieu (Ritchie *et al.*,

2001). La EC50 correspond à une concentration en métal induisant 50% de la réduction d'émission lumineuse par comparaison avec un témoin exempt de métal. Dawson et al. (2006) ont évalué la toxicité du Cd dans un sol en mesurant la diminution de la luminescence de la population de bactéries (bactéries porteuses de gènes *lux*) quand elles sont exposées à des échantillons environnementaux contaminés.

#### **I.3.4.3. Méthodes physiques**

Les méthodes physiques décrites dans cette partie sont des méthodes spectroscopiques et microscopiques, qui fournissent des informations sur la spéciation des métaux à l'échelle moléculaire et sur les associations entre éléments à l'échelle microscopique (Mercier *et al.*, 2002). Elles peuvent être réparties en deux groupes : les techniques d'analyses globales et les techniques de microanalyses. Ces méthodes sont généralement non destructives, et la perturbation du système varie selon le type de conditionnement utilisé, par exemple l'inclusion dans une résine lors de la confection de lames minces.

Les méthodes physiques décrites sont basées sur l'interaction entre un rayonnement incident (rayonnement électromagnétique, électron, protons...) et la matière.

La palette de techniques physiques d'analyses existantes ayant déjà été appliquées aux sédiments et plus généralement aux sols est très étendue. Dans les paragraphes suivants, nous ne passerons en revue qu'un certain nombre d'entre elles et détaillerons plus particulièrement les techniques que nous avons choisi d'utiliser dans le cadre de ce travail de thèse. Le choix des techniques utilisées a été fait en fonction : (i) de leur adéquation par rapport aux questions posées, et des résultats obtenus dans des études menées sur des sédiments ou des sols, (ii) de la possibilité d'application de ces techniques sur nos échantillons, notamment au niveau de la préparation des échantillons, et (iii) de l'accessibilité à ces techniques.

##### Techniques d'analyses globales

Les techniques d'analyses globales fournissent une information sur l'échantillon pris dans sa totalité. La diffraction des rayons X renseigne sur les principaux constituants cristallisés des sols et contribue ainsi à orienter les micro-analyses ultérieures. Elle permet exceptionnellement la mise en évidence de phases propres d'éléments métalliques: par exemple, Laperche et al (1996) et Juillot (1998) identifient des

phosphates de plomb (respectivement pyromorphite et plumbogummite) en appliquant la diffraction des rayons X sur des fractions pré-concentrées de sol intensément pollué. Isaure et al. (2001) et Panfili et al. (2005) ont identifié de la sphalérite, de la franklinite et de la willémitte dans des sédiments provenant de la Scarpe (59- France).

Cependant, cette méthode n'est pas sensible aux phases amorphes, mal cristallisées et aux espèces adsorbées. Pour cela, il est nécessaire d'utiliser des techniques sensibles à l'environnement local d'un élément. De plus, pour les contaminants moins intenses, il est impossible de détecter la présence de phases cristallisées métallifères.

La spectroscopie d'absorption X incluant la partie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) et XANES (X-Ray Absorption Near Edge Structure) est bien adaptée car elle donne des informations sur l'environnement local de l'élément trace étudié (spéciation au sens strict: degré d'oxydation, nature des atomes voisins et distances inter atomiques; Brown, 1988) et ceci même pour des teneurs relativement faibles (quelques dizaines à centaines de  $\text{mg kg}^{-1}$ ).

### *Spectroscopie EXAFS*

La spectroscopie EXAFS a été développée lorsque des faisceaux X issus de rayonnement synchrotron ont été disponibles. Quelle que soit la ligne de lumière sur laquelle on travaille, le montage expérimental de base est constitué d'un monochromateur et de deux détecteurs placés avant et après l'échantillon (Fig. I-10)

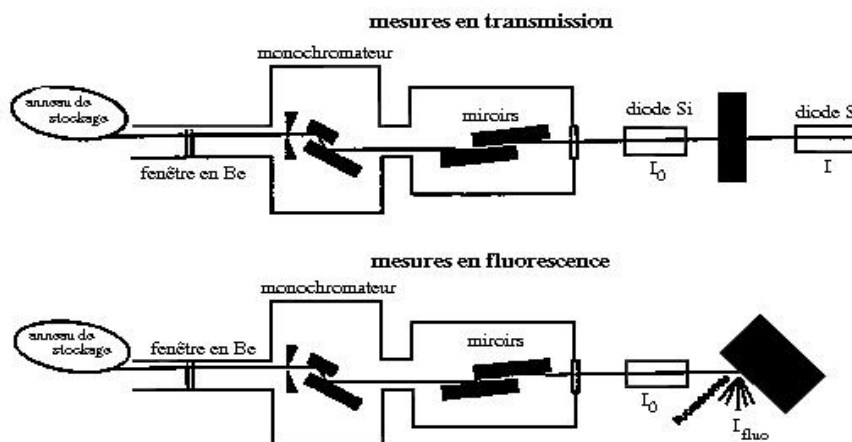


Figure I-10 : Montages expérimentaux en transmission et en détection de fluorescence

La méthode consiste à mesurer  $\mu x$  de l'échantillon étudié en fonction de l'énergie du rayonnement incident. En mode transmission,  $\mu x$  est défini par la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp(-\mu x),$$

$I_0$  et  $I$  représentent respectivement l'intensité du faisceau incident et l'intensité du faisceau transmis,  $x$  l'épaisseur de l'échantillon,  $\mu$  le coefficient d'absorption linéaire.

Lorsque les échantillons sont dilués, le coefficient d'absorption est égal au rapport  $I_1/I_0$  ou  $I_1$  est l'intensité de fluorescence. Elle est mesurée par un détecteur multi-éléments au germanium résolu en énergie (par exemple un détecteur Canberra – 30 éléments sur la ligne FAME, ESRF – Grenoble). Ce type de détecteur est positionné à  $45^\circ$  de l'échantillon (Fig. I-10 et I-11). Pour une mesure en mode fluorescence, il est impératif que l'élément étudié ne soit pas trop concentré afin d'éviter tout phénomène de réabsorption par l'échantillon.

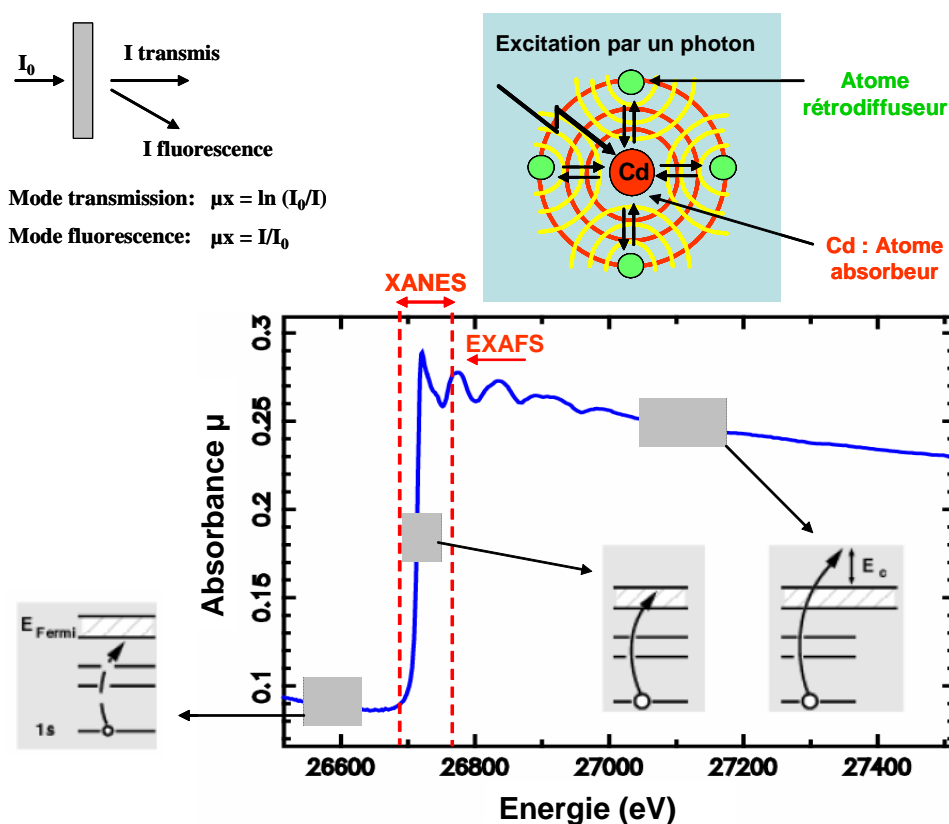


Figure I-11: Principe physique de la spectroscopie d'absorption des rayons X, exemple d'un spectre au seuil K du Cd.

Plusieurs régions sont à considérer dans un spectre d'absorbance (Fig. I-11) :

- la première région se caractérise par une décroissance monotone de l'absorbance en fonction de l'énergie croissante des rayons X. L'énergie incidente est alors inférieure à l'énergie de liaison des électrons de cœur de l'atome cible et les rayons X ne sont donc pas absorbés par l'atome cible.
- la deuxième région se caractérise par une augmentation brutale de l'absorbance, à une valeur d'énergie donnée appelée seuil d'absorption. La valeur  $E_0$  de l'énergie du seuil d'absorption dépend de la nature de l'atome étudié. A cette valeur, l'énergie incidente est égale à l'énergie de liaison des électrons de cœur de l'atome étudié. Avant que l'énergie incidente n'atteigne  $E_0$ , l'électron passe de son état fondamental à un état excité situé au dessous du niveau de Fermi. L'analyse de cette zone du spectre fournit des informations sur la structure électronique de l'atome étudié. Lorsque l'énergie incidente atteint  $E_0$ , l'électron de cœur est éjecté vers le continuum. A des valeurs d'énergies de  $E_0 + 50$  eV, l'énergie cinétique du photo-électron éjecté est faible et son libre parcours moyen est grand (plusieurs dizaines d'Å). L'onde associée sonde alors un large domaine spatial, et il peut se produire des phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Cette région autour de l'énergie de seuil est appelée XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) et donne des informations sur l'état d'oxydation de l'atome cible, la structure électronique de l'atome central et la géométrie de coordination.
- la troisième région spectrale se caractérise par des oscillations de l'absorbance. Cette région s'étend d'environ  $E_0 + 50$  eV à  $E_0 + 1000$  eV. A ces énergies, l'énergie cinétique du photo-électron éjecté est suffisante pour qu'il soit considéré comme libre et son libre parcours moyen est de ce fait limité. L'onde sonde un faible domaine spatial autour de l'atome absorbeur ( $\sim 3-4$  Å). Dans le cas d'un composé, la sphère de coordination de l'atome cible contient d'autres atomes : l'onde associée au photo-électron éjecté est rétrodiffusée par ces atomes voisins et interfère avec l'onde émergente, donnant lieu à des oscillations de l'absorbance dites oscillations EXAFS. Le signal EXAFS, dans le formalisme d'onde sphérique et l'hypothèse de la diffusion simple, peut s'écrire :

$$\chi(k) = -S_0^2 \sum_i N_i \frac{|f(\pi, k)|}{kR_i^2} e^{(-2\sigma^2 k^2)} e^{\left(\frac{2R}{\lambda(k)}\right)} \sin(2kR_i + 2\delta_i + \Phi_i(\pi, k))$$

Avec :

- $S_0^2$  : Facteur de réduction d'amplitude due aux effets multiélectroniques.
- $N_i$  : Nombre d'atomes présents dans la couche  $i$ .
- $|f(\pi, k)|$  : Facteur d'amplitude de rétrodiffusion produit par un atome de la couche  $i$ .
- $R_i$  : Distance effective entre les atomes appartenant à la couche  $i$  et l'atome absorbeur.
- $\sigma^2$  : Facteur de Debye-Waller ou facteur de désordre. Le désordre peut être dû à une agitation des atomes (désordre thermique) ou être structural (répartition désordonnée des atomes autour de l'atome cible). Plus le désordre est grand, plus les oscillations EXAFS sont atténuées.
- $\lambda$  : Libre parcours moyen dans le matériau pour un électron d'une énergie moyenne.
- $\delta_i$  : Déphasage dû aux couches électroniques des atomes composants la couche  $i$ .
- $\Phi_i(\pi, k)$  : Déphasage produit par la rétrodiffusion.

L'étude de ces oscillations fournit donc des informations structurales sur l'environnement local de l'élément étudié *i.e.* la nature, le nombre des atomes entourant l'atome absorbeur et les distances interatomiques. Il est alors possible d'étudier des composés amorphes ou mal cristallisés. En outre, la technique est spécifique à un élément cible donné, ce qui en fait une sonde structurale locale et chimiquement sélective.

Les méthodes de spectroscopie d'absorption comme l'EXAFS et le XANES ont été appliquées depuis une quinzaine d'années à l'étude des sols et sédiments pollués en Pb, Cu et en Zn (par exemple, Manceau et al., 1996; Hargé, 1997; Juillot, 1998; Morin et al., 1999 ; Ostergren et al., 1999 ; Manceau et al., 2000; Carroll et al., 2002; Isaure et al., 2002 ; DeVolver et al., 2003 ; Panfili et al., 2005 ; Peltier et al., 2005 ; Kirpichtchikova et al. 2006 ; Terzano et al. 2007; Strawn & Baker 2008) ; mais aussi pour des matrices contaminées en Cd (O'Day et al., 1998 ; Liu et al., 2001 ; Trivedi et al., 2001 ; Carroll et al., 2002).

La spectroscopie XANES est également utilisée pour déterminer la spéciation des éléments légers comme le soufre (Myneni et al., 2002)

Malgré leur grand intérêt pour l'étude des ETM dans les systèmes naturels, ces méthodes présentent certains inconvénients. Elles nécessitent généralement l'acquisition préalable de spectres de composés de référence et présentent des limites de détections encore trop élevées pour l'étude des sols peu pollués (i.e. n'ayant pas ou peu reçu d'apports). Mais surtout, l'accès aux lignes de lumière se fait par un comité de programme et la demande est très largement supérieure à l'offre. Ces techniques ne sont donc pas des méthodes de diagnostic applicables en routine.

### Techniques d'analyses latéralement résolues

Dans les paragraphes suivants, nous traiterons tout d'abord des techniques d'imagerie, puis nous terminerons par les techniques de spéciation renseignant sur les paramètres structuraux.

Les méthodes de visualisation et d'analyses qualitatives ou quantitatives ponctuelles, que constituent les microscopies électroniques à balayage (MEB) et à transmission (MET), la micro-fluorescence X, l'ablation laser couplée à l'analyse chimique ICP/MS (Induced Coupled Plasma/Mass Spectrometry), la microsonde électronique, la spectroscopie photoélectronique aux rayons X, la spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford, etc, permettent l'analyse multi-élémentaire de quelques  $\mu\text{m}^3$  de constituants du sol. Il est ainsi possible, d'après la composition chimique obtenue, d'identifier des associations entre éléments et de faire des hypothèses sur les phases présentes. Les ETM de ces constituants, sous réserve d'être présents à des teneurs de quelques ppm (limite de sensibilité variable selon les éléments et les techniques d'analyses) peuvent être ainsi identifiés (Morin et al., 1999; Sobanska, 1999).

### *Microscopie électronique à balayage (MEB) couplé à la microanalyse X avec sonde EDS (détection par dispersion d'énergie).*

Cette technique permet l'acquisition d'images à forts grossissements (jusqu'à X50000, i.e. visualisation des particules de taille supérieure ou égale à quelques nm et une grande profondeur de champ (bonne netteté de l'image et mise en relief des particules). Les images acquises donnent des informations sur la topographie et le contraste chimique, avec une résolution latérale de 100 nm environ. C'est une technique non destructive qui permet de travailler sous vide secondaire ou sous pression partielle d'argon. Le MEB

peut être couplé à un détecteur de photons X qui permet l'analyse chimique élémentaire (EDS) de la plupart des éléments de la classification périodique à partir du carbone. Ainsi, cette technique permet de faire des analyses qualitatives à partir du carbone et quantitatives à partir de l'oxygène, sur un volume d'environ  $1 \mu\text{m}^3$ . Cet outil permet aussi de réaliser des cartographies élémentaires.

Le principe de cette technique repose sur les interactions entre les atomes constituant la surface de l'échantillon et les électrons du faisceau incident. La surface de l'échantillon est balayée par un faisceau focalisé d'électrons (accélérés à des tensions généralement comprises entre 10 et 30 kV) qui va interagir avec la matière (rayonnement primaire). De ces interactions électrons-matière découlent de nombreux rayonnements secondaires (Fig. I-12) :

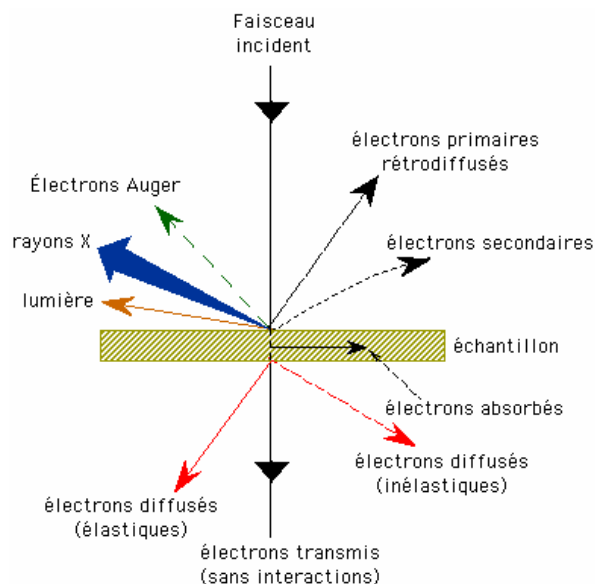


Figure I-12 : Rayonnements secondaires produits par interaction d'un électron primaire avec l'échantillon dans un microscope électronique à Balayage.

Les électrons (secondaires et rétrodiffusés) sont collectés par des détecteurs spécifiques, en synchronisant la détection (intensité) au balayage du faisceau incident. On obtient ainsi une image de la surface dont le contraste est fonction du type d'électrons sélectionnés via le détecteur, de la tension d'accélération choisie, de la nature des atomes présents dans l'échantillon. On obtient ainsi des images avec : (i) un contraste topographique par imagerie par détection d'électrons secondaires, et (ii) un contraste chimique par imagerie par détection des électrons rétrodiffusés.



Micro-analyse élémentaire par spectrométrie de dispersion d'énergie (EDS) :

Parmi les phénomènes induits lors de l'interaction entre le faisceau primaire d'électrons et la matière, il se produit une émission de photons X (d'une énergie comprise entre 0,5 et 30 keV). Ce rayonnement X est collecté par un détecteur, capable de déterminer l'énergie des photons qu'il reçoit. L'énergie de ces photons X est caractéristique des atomes qui les ont émis, d'où la possibilité de réaliser des analyses élémentaires, qui peuvent être qualitatives (identifications des éléments présents dans le matériau) ou quantitatives (pourcentage atomique et/ou massique de chaque élément). Le temps nécessaire pour acquérir un spectre de bonne qualité pour une particule est de l'ordre de la minute. Les éléments en quantité inférieure à environ 0,2% en masse (dans le micro-volume analysé) ne peuvent pas être détectés, ni les éléments légers : H, Li et Be. La fluorescence de ces éléments légers étant moins énergétique, elle est en partie arrêtée par la fenêtre en béryllium du détecteur. Il est également possible d'accéder à la localisation des différents éléments au sein du matériau (cartographies).

L'analyse EDS est dite « semi-quantitative » car la quantification exacte des concentrations des éléments détectés est assez difficile à établir en raison de la difficulté à établir le volume d'échantillon réellement analysé.

L'accès au MEB est en outre relativement aisé. Les inconvénients de cette technique sont liés à la limite de détection qui reste élevée par rapport à la micro-fluorescence et au fait que l'échantillon soit placé sous vide, ce qui implique qu'on ne peut observer que des échantillons conducteurs. Un conditionnement des échantillons de faible conductivité électrique est nécessaire (e.g. déshydratation par lyophilisation et métallisation, par ajout d'une couche de chlorure d'argent, permettant d'évacuer les charges) afin d'éviter un effet de charge. Toutefois, il est aujourd'hui possible de travailler sous vide partiel, ce qui supprime la nécessité de métalliser les échantillons. Les MEBE (microscope électronique à balayage « environnemental ») permettent de travailler sur n'importe quel échantillon (non conducteur, hydraté, etc...), sans aucun traitement préalable.

Notons que les analyses réalisées au MEB permettent de mettre en évidence des associations entre éléments et de faire des hypothèses sur les phases, elles ne permettent

pas de conclure sur une association à l'échelle moléculaire ni de déterminer le type d'interaction (sorption, co-précipitation) (Morin et al., 1999).

Dans une étude sur des sédiments pollués, O'Day et al. (1998) ont mis une évidence une association Zn-Fe qui suggère une association de Zn avec des oxyhydroxydes de fer présents sous forme d'enrobage autour des particules de ZnS résiduelles. Webb et al. (2000) ont trouvé une association Zn-P dans du sédiment, contaminé par des fertilisants phosphatés, prélevé à proximité de la source de contamination et une association Zn-S dans du sédiment éloigné de la source. Panfili et al. (2005) ont pu mettre en évidence différentes associations élémentaires du Zn par MEB-EDS dans la rhizosphère de plusieurs espèces végétales lors d'expériences de phytostabilisation sur des sédiments de curage. Par l'étude systématique de grains formés à proximité des racines, 231 spectres EDS ont été engendrés, ce qui a permis de classer les grains observés en 7 classes selon leur composition et les associations géochimiques majoritaires.

#### *La micro spectrométrie Raman*

La spectroscopie Raman est une méthode de spectroscopie vibrationnelle qui permet d'identifier des phases minérales. En mode microfocalisé, on peut identifier des phases minérales sur des lames minces avec une résolution latérale de quelques  $\mu\text{m}^2$ . Cette technique est beaucoup utilisée en Sciences de la Terre, mais également en Sciences de l'Environnement (D'Amore J J, Al-Abed S R, Scheckel K G and Ryan J A 2005 Methods for speciation of metals in soils: A review. Journal of Environmental Quality 34, 1707).

#### *Micro-Fluorescence X sur rayonnement synchrotron*

L'utilisation d'un faisceau focalisé de rayons X ou de particules chargées accélérées permet la mise en œuvre des spectrométries d'émission X à l'échelle microscopique, et la reconstruction d'images de distribution des éléments chimiques. La fluorescence correspond au mode de désexcitation d'un atome ayant absorbé une particule. Pour les analyses menées en micro-fluorescence X, les particules sont des photons X dont l'énergie est préalablement sélectionnée en monochromatisant le faisceau. La résolution spatiale du faisceau peut atteindre l'échelle du micromètre (Kaplan et al., 1994 ; Yun et al., 1998 ; Duff et al., 1999 ; Morin et al., 1999 ; Kirpichtchikova et al., 2006). Ainsi des

phases de cette taille peuvent être sondées, telles les phases zincifères dans un sol pollué en Zn, Pb et Cu (Kirpichtchikova et al., 2006) ou dans des sédiments de curage (Isaure et al., 2005 ; Panfili et al., 2005).

De plus, l'intensité des faisceaux X générés par un rayonnement synchrotron permet d'abaisser les limites de détection à quelques ppm. Cette technique non destructive permet d'obtenir des informations sur l'environnement chimique local de l'élément étudié (Xia *et al.*, 1997 ; Lobinski et al., 2006). Il est également possible de réaliser la cartographie des éléments chimiques et de mettre en évidence d'éventuelles associations géochimiques dans l'échantillon. Le caractère monochromatique du rayonnement source permet dans certains cas l'identification des états d'oxydation des éléments. Par exemple, Ortega et al. (2005) ont mis en évidence la distribution du K, du Cr total mais aussi du Cr hexavalent dans des cellules en cultures exposées à des composés de Cr. L'imagerie des états d'oxydations est permise par le choix de l'énergie du faisceau incident

#### *L'ablation laser couplée à l'analyse chimique ICP/MS*

Cette technique permet d'atteindre des seuils analytiques très bas en ETM et ce, principalement pour les constituants grossiers en raison du volume du cratère d'impact relativement important. Cette méthode chimique, destructrice, est intégrée dans une démarche de préparation des matériaux qui la rapproche des méthodes d'analyses physiques.

#### *Emission de rayon X induite par des particules chargée (particle induced X-ray emission - PIXE) et spectrométrie de rétrodiffusion Rutherford (Rutherford backscattering spectrometry - RBS).*

La spectrométrie PIXE fournit des informations sur la distribution d'éléments avec  $Z > 12$ , la RBS fournit des informations sur les éléments plus légers et sur la répartition des éléments en profondeur (Isaure *et al.*, 2001). L'analyse micro-PIXE est basée sur un principe similaire mais l'emploi de protons permet d'améliorer la sensibilité de détection (bruit de fond moins important qu'avec la sonde électronique). Ces deux techniques combinées avec l'EXAFS ont permis la distinction de deux formes de Zn

dans un sédiment de la Scarpe, une associée au fer et une aux sulfures (Isaure *et al.*, 2001).

#### *Techniques micro-spectroscopiques : $\mu$ -EXAFS, $\mu$ -XANES*

Le principe de l'EXAFS résolu latéralement, ou  $\mu$ -EXAFS, est le même que l'EXAFS conventionnel (non résolu latéralement). Il en est de même pour le  $\mu$ -XANES. Mais dans ces deux cas, les expériences sont menées avec un faisceau X focalisé sur quelques  $\mu\text{m}^2$ . Les techniques permettent toujours de sonder l'environnement chimique et structural d'un atome cible (autour de 3-4 Å), mais l'information sera moyennée sur un volume beaucoup plus petit qu'en EXAFS ou XANES classiques. Ainsi, le volume étudié étant plus petit, le nombre d'espèces présentes sera réduit, il sera alors possible de mettre en évidence le signal d'espèces individuelles. Ces 2 spectroscopies nécessitent un repérage préalable par MEB-EDS ou  $\mu$ -fluorescence X des zones d'intérêt sur l'échantillon.

Des travaux utilisant le  $\mu$ -EXAFS pour identifier des phases métallifères dans des sols et des sédiments ont montré la complémentarité des spectrométries non résolues et résolues latéralement (Manceau *et al.*, 2000; Isaure *et al.*, 2002; Manceau *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002; Kirpichtchikova *et al.*, 2003 ; 2006; Panfili *et al.*, 2005).

## **I.4. Evolution de la mobilité du Cd présent dans un sédiment de mis en dépôt et après une culture de plante**

### **I.4.1. Impact de la mise en dépôt de sédiment**

Lors du curage, la remise en suspension du sédiment provoque un passage de conditions réductrices vers des conditions oxydantes (Bourg, 1988) entraînant des modifications géochimiques au sein du sédiment : oxydation des phases les plus sensibles (sulfures, matière organique), effet induit sur le pH, développement d'une microflore aérobie... Ces modifications influencent le statut chimique des métaux (Calmano *et al.*, 1993) et peuvent augmenter leur biodisponibilité et leur lessivage (Cappuyns & Swennen, 2005). De nombreux auteurs ont mis en évidence l'association des métaux comme Cd et Zn aux sulfures dans les sédiments de fond de cours d'eau (Isaure *et al.*, 2001 ; Audry *et al.*, 2005). Ces sulfures peuvent provenir directement de sources anthropiques (scories de fonderie par exemple, Isaure *et al.*, 2002) ou être formés lors de la diagenèse précoce des sédiments (voir le paragraphe I.3.3.5). L'oxydation des sulfures libère des ions  $H^+$  et peut entraîner une acidification du milieu (Caetano *et al.*, 2003), qui à son tour déstabilise d'autres phases porteuses de métaux augmentant ainsi leur mobilité (ex : Hg, Zb, Pb, Cu et Cd ; Förstner & Kersten, 1988 ; Caetano *et al.*, 2003). Les cinétiques de remise en solution des métaux lors d'un contact sédiment/eau ne sont cependant pas les mêmes pour tous les métaux, Zn est ainsi moins vite solubilisé que Cu, Pb et Hg (Caille *et al.*, 2003). Les métaux libérés sont susceptibles de rester en solution, sous forme libre, associés à des colloïdes ou complexés (acides organiques solubles, chlorures...) ou de s'associer à de nouvelles phases solides. Les réactions prépondérantes sont alors celles de sorption/désorption et de précipitations autres que celles avec les sulfures (Bourg, 1988), notamment avec les hydroxydes de Fe et de Mn (Caetano *et al.*, 2003).

Le séchage consécutif à la mise en dépôt des sédiments extraits constitue une étape cruciale de leur évolution (Bert *et al.* 2009). Lors du séchage, l'oxydation des sulfures entraîne ainsi une libération de protons. L'acidification du sédiment qui en résulte dépend de l'effet tampon des carbonates, des cations échangeables, des argiles et des hydroxydes d'Al. Ainsi, en milieu carbonaté, on n'observe pas forcément de baisse importante de pH liée à l'oxydation des sulfures (Lors *et al.*, 2004). Les effets du

séchage ont été mis en évidence par Tack *et al.* (1996) par comparaison de l'évolution d'un sédiment maintenu sous une lame d'eau et d'un sédiment bien drainé (Tack *et al.*, 1996). Après 2 semaines de dépôt, les différences ne sont pas significatives entre les modes de stockage. Après 3 mois, des différences apparaissent. Dans les sédiments séchés, la solubilité de Cd, Cu, Pb et Zn augmente pour une large gamme de pH, tandis que celle du Fe diminue; et l'extractibilité à l'eau de Zn, Cd, Cu et Pb augmente. Ces changements sont dus au passage d'une association avec les sulfures à une association avec les oxydes de Fe et la matière organique. Cette évolution est également mise en évidence par Khalid *et al.* (1981) dans une étude de la répartition de Cd au sein d'un sédiment exposé à différentes conditions de pH et de potentiel rédox. Isaure (2001) a montré que deux ans après la mise en dépôt de sédiments contaminés, la majorité du zinc, initialement sous forme de sphalérite, se retrouvait associée à des oxyhydroxydes de fer, et dans une moindre mesure à des phyllosilicates.

La rétention des métaux dans les compartiments « matière organique » et « oxydes de fer » est sujette aux variations saisonnières (Isaure *et al.*, 2005 ; Piou *et al.*, 2009). Ces différents auteurs ont pu montrer, à partir du suivi de dépôts de sédiments, l'alternance été/hiver du piégeage et relargage des métaux qu'ils attribuent aux cycles de réduction des oxydes de fer et de minéralisation de la matière organique. Sur des sédiments récemment mis en dépôt sur sol, une étude sur les premières semaines de séchage d'une colonne de sédiments a permis de mettre en évidence une hausse de l'extractibilité des métaux à l'eau, au bout de 4 à 5 semaines après la mise en dépôt. Cette phase est suivie d'une baisse de cette même extractibilité après 9 semaines de dépôt, qui pourrait être due à la baisse de perméabilité pour l'oxygène du sédiment lors du séchage et à un retour à des conditions réductrices (Stephens *et al.*, 2001).

#### **I.4.2. Facteurs abiotiques influençant l'évolution des ETM dans les sédiments**

Les dépôts de sédiments de curage sont soumis aux conditions climatiques, qui peuvent avoir un impact sur leur évolution. Des variations de la teneur en eau sont ainsi susceptibles de modifier les caractéristiques physico-chimiques des sédiments (Crosnier & Delolme, 2002).

#### I.4.2.1. Potentiel d'oxydoréduction (Eh) et lessivage

Comme vu précédemment (section I.3.3.), le potentiel d'oxydoréduction influence le devenir des métaux, i) via un changement de l'état d'oxydation du métal lui-même, ii) via le changement du degré d'oxydation d'éléments auxquels se lie le métal pour former un complexe soluble, et enfin iii) par la formation ou la dissolution de phases porteuses (surtout des oxydes de Fe) accueillant le métal (Trolard *et al.*, 2002).

Le lessivage peut conduire à un déplacement des métaux présents dans les sédiments (migrations sous-jacentes) (Bert *et al.* 2009). Le transfert particulaire de ZnS et de Zn-ferrihydrite est ainsi à l'origine de l'enrichissement en Zn sur 20 cm d'un sol sous-jacent à un dépôt de 40 cm de sédiments de curage, cet enrichissement atteint, en 27 mois, un facteur supérieur à 3 sur 10 cm (Isaure *et al.*, 2005). Cet enrichissement représente 1,2% de la quantité totale de Zn du dépôt (Isaure *et al.*, 2005). L'apport de zinc en provenance du sédiment sus-jacent est confirmé par le changement de nature des phases porteuses de Zn dans ce sol : initialement Zn est associé majoritairement aux phyllosilicates de la matrice argileuse et apparaît ensuite sous forme de ferrihydrite (Isaure *et al.*, 2005). Un travail de modélisation mené par Tack *et al.* (1999) basé sur le suivi du Cd dans les lixiviats d'un sol sous un dépôt de sédiment contaminé a montré que le Cd pourrait se retrouver en faible quantité à 2m de profondeur dans le sol sous-jacent.

Du fait de la présence de métaux, les lixiviats de dépôts de sédiment sont potentiellement toxiques (Bert *et al.* 2009). Compte tenu de la dynamique des métaux au sein du dépôt, cette toxicité évolue, en particulier selon les cycles saisonniers (Piou *et al.*, 2009).

#### I.4.2.2. Cycles de séchages humidifications

Les effets de l'alternance de périodes de séchage et de réhumidification et, plus largement, de périodes anoxiques et oxydantes, sont multiples. D'une manière générale, cela augmente l'activité biologique du sol et améliore sa structuration (Tessier, 1994). Une réduction de la teneur en eau entraîne en général l'apparition de fissures (Tessier, 1994; Crosnier & Delolme, 2002), qui favorisent l'écoulement suivant des chemins préférentiels. Les cycles accélèrent en outre la décomposition et la minéralisation des

composés humiques les plus labiles (Mitchell & Baldwin, 1998). Par ailleurs, ces cycles perturbent la stabilité des agrégats du sol suivant la nature et la quantité de la fraction argileuse et de la matière organique (Crosnier & Delolme, 2002).

Les périodes humides sont favorables à la dissolution des calcaires (Duchaufour, 1995). Suite au séchage, le pH diminue, le carbone organique dissous augmente et la capacité d'échange cationique (CEC) diminue (Courchesne *et al.*, 1995). Des études du transfert du Zn dans le sol suite au dépôt de sédiments de curage rapporte que la solubilisation du Zn est cyclique et se fait de manière plus importante l'été car l'assèchement des sédiments favorise l'oxydation des sulfures (Bostick *et al.*, 2001 ; Isaure *et al.*, 2001).

Le cycle oxydation/réduction conduit sur un sédiment frais par aération, permet de mettre en évidence une hausse du potentiel rédox et une baisse du pH lors de l'oxydation. Ces modifications s'accompagnent d'une augmentation des teneurs en métaux (Cu, Pb, Cd et Zn) de la solution. La succession de cycles d'oxydation et de réduction entraîne de plus une réorganisation de la distribution des métaux. A partir d'extractions sélectives, il semble que les métaux passent des pools organiques-sulfures et réductibles aux pools carbonates-échangeables et en solution (Calmano *et al.*, 1993).

Le passage à des conditions réductrices suite à une inondation ou une forte activité biologique entraîne la réduction du  $Mn^{4+}$  en  $Mn^{2+}$  et du  $Fe^{3+}$  en  $Fe^{2+}$ . Les métaux leur étant associés sont alors solubilisés; de plus, les ions  $Mn^{2+}$  et  $Fe^{2+}$  entrent en compétition avec les ions métalliques pour l'occupation des sites d'adsorption (Bourg, 1988). En cas de fortes pluies, le détrempage prolongé du dépôt de sédiments peut générer des conditions réductrices et solubiliser les oxyhydroxydes et les métaux qui leur sont associés ; ce phénomène est d'autant plus important que le milieu est riche en matière organique (Benner *et al.*, 1999). Les cycles d'inondation/exondation sont également importants, le coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau étant 10 000 fois plus petit que dans l'air, les sols inondés sont immédiatement anoxiques (Brune *et al.*, 2000). Le retour à des conditions oxiques entraîne la dissolution des sulfures. Une baisse du pH et un flux de Zn est ainsi observé sous un dépôt de sédiment de curage lors du retour à des conditions oxydantes (Isaure *et al.*, 2005).



### **I.4.3. Facteurs biotiques de l'évolution des ETM des sédiments : effet des plantes dans la rhizosphère**

La rhizosphère est définie comme la région d'un sol sous influence de l'activité racinaire, ce qui correspond approximativement aux premiers millimètres du sol adhérent aux racines (Hinsinger, 1998). Les conditions physico-chimiques dans la rhizosphère sont différentes de celles rencontrées dans le reste du sol. Les racines enrichissent le milieu en carbone et favorisent ainsi l'établissement et la biodiversité des micro-organismes (bactéries, mycorhizes...). Ces micro-organismes interviennent dans la dynamique des ETM dans les sols (Lamy *et al.*, 2006). Les processus impliqués sont variés, certains micro-organismes vont par exemple entrer en compétition avec la plante pour l'absorption de certains éléments comme le Zn (Hinsinger, 2001 ; Kidd *et al.*, 2009). D'autres peuvent détruire la matière organique et libérer les éléments traces chélatés par les acides humiques, qui entrent alors dans la solution du sol (Feix & Tremel-Schaub, 2005). Concernant les sédiments, le rôle des microorganismes bactériens, dont les endophytes, et les mycorrhizes dans l'augmentation ou la diminution de la mobilité des ETM est résumé dans Bert *et al.* (2009). La macrofaune est aussi connue pour interagir fortement avec les matières organiques des sols et le cycle des éléments majeurs, et par conséquent celui des ETM. Par exemple une étude en microcosme menée par Lamy *et al.* (2006) a montré que les vers de terre *Nicodrilus giardi* étaient capables de modifier la spéciation des éléments traces.

Les effets des micro-organismes et de la macrofaune sur la dynamique des ETM ne seront pas abordés dans ce manuscrit. Nous nous focalisons sur les effets de la plante.

#### **I.4.3.1. Influence des plantes sur le pH et potentiel d'oxydoréduction**

Les processus de végétalisation peuvent avoir un impact sur la mobilité des métaux des dépôts de sédiments (Marseille *et al.*, 2000 ; Bert *et al.* 2009). A défaut d'une végétalisation, une couverture végétale s'installe spontanément sur les dépôts malgré les teneurs en polluants des sédiments (Vauléon *et al.*, 2001; Bert *et al.* 2009) ; les espèces présentes proviennent des environs du dépôt. Certaines espèces, comme *Urtica dioica* sont ubiquistes des sites de dépôts de sédiments de curage (Edwards *et al.*, 1998)..

La modification induite par les plantes sur la spéciation des ETM et leur biodisponibilité dans la rhizosphère dépend des concentrations élémentaires, du pH,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$ , du potentiel redox, des concentrations en ligand organiques (Puschenreiter *et al.*, 2005; Martínez-Alcalá *et al.*, 2009).

Le rôle direct des plantes est lié à leur capacité d'échange de composés avec la solution du sol (Andrade et al, 2002). En effet, les racines peuvent libérer différents exsudats, des cellules mortes, de l' $\text{O}_2$  et du  $\text{CO}_2$  qui vont modifier le pH et le potentiel d'oxydoréduction de la solution du sol (Fig. I-13).

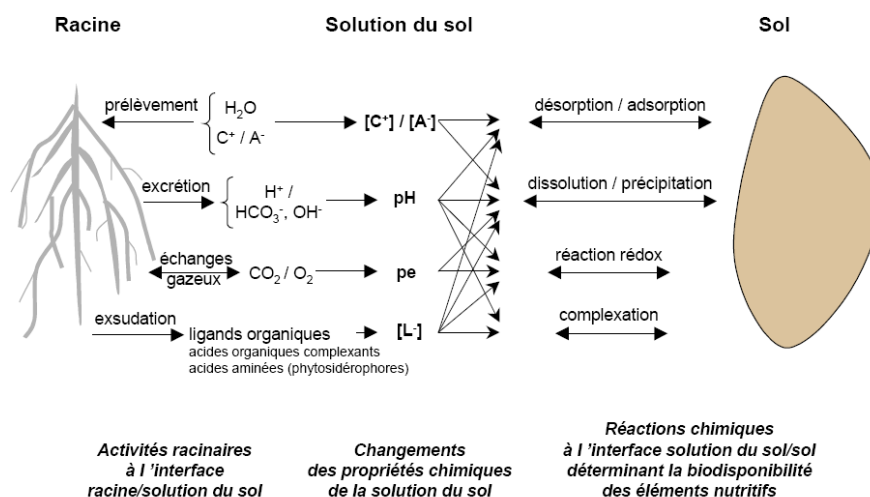


Figure I-13 : Représentation schématique des principales interactions entre le système racinaire et le sol (adapté de Hinsinger, 2001).

Des changements de pH importants sont observés dans la rhizosphère, ceux-ci étant essentiellement le résultat des différences d'absorption des nutriments sous forme de cations et d'anions par les plantes (Hinsinger *et al.*, 2003) (Fig. I-13). Pour maintenir l'équilibre électrostatique et un pH constant dans les cellules racinaires ( $\sim 7.3$ ), les prélèvements de cations sont exactement compensés par la libération d'ions  $\text{H}^+$  ou le prélèvement d'anions, et les prélèvements d'anions par la libération d'ions  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ , ou le prélèvement de cations.

On peut également relever le rôle majeur de l'azote, nutriment essentiel pour le bilan des charges de la plante, dans les variations de pH de la rhizosphère. Il peut effectivement être prélevé sous forme anionique ( $\text{NO}_3^-$ ), cationique ( $\text{NH}_4^+$ ) ou neutre

(N<sub>2</sub>). Ainsi, selon la forme azotée disponible dans le milieu, la rhizosphère sera acidifiée ou au contraire alcalinisée (Chaignon, 2001 ; Hinsinger *et al.*, 2003).

Les modifications de pH dans la rhizosphère sont également liées à la nutrition des plantes, notamment l'absorption d'ions NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. L'excrétion d'acides organiques de faible masse molaire (citrate, malate,...) n'influe pas sur le pH car ils ne sont pas libérés sous forme d'acide. En revanche, comme tous les composés chargés libérés par les cellules racinaires, leur libération est compensée par l'échange d'un ion de charge opposée, ce qui peut au final avoir un effet sur le pH (Hinsinger *et al.*, 2003).

Le milieu peut être acidifié par la libération de CO<sub>2</sub> dans la rhizosphère (production d'acide carbonique) qui provient de la respiration des racines et des micro-organismes (consommation de O<sub>2</sub>). Cela provoque aussi un léger abaissement du potentiel redox au voisinage des racines (Chaignon, 2001 ; Hinsinger, 2001 ; Panfili, 2004 ; Feix & Tremel-Schaub, 2005 ; Hinsinger & Courchesne, 2008).

Le développement des racines va lui aussi entraîner des variations de pH en modifiant la structure physique initiale du sédiment pour former une structure plus aérée, ce qui provoque aussi une augmentation du potentiel redox (Marseille *et al.*, 2000).

L'intensité et le sens de la modification du pH dépendent principalement de l'espèce végétale, de son stade de développement (la quantité d'éléments prélevés diminue avec le développement de la plante), des conditions nutritives et de la capacité du sol à tamponner le milieu. Il est ainsi fréquent d'observer des variations du pH rhizosphérique jusqu'à 1-2 unités par rapport au reste du sol pour de nombreuses espèces végétales (Marseille *et al.*, 2000 ; Hinsinger, 2001 ; Hinsinger *et al.*, 2002 ; Panfili, 2004 ; Feix & Tremel-Schaub, 2005 ; Hinsinger & Courchesne, 2008).

Le prélèvement en ETM par les plantes sera aussi influencé par d'autres paramètres tels que la température ou la lumière. En effet, celui-ci tend à augmenter quand la lumière et la température du sol augmentent jusqu'à des valeurs optimales. De même, l'humidité intervient directement en favorisant l'activité biologique, en modifiant le potentiel d'oxydo-réduction du sol ou encore en influant sur la profondeur d'enracinement. Ainsi, les années sèches, les racines descendant plus profondément dans le profil du sol prélèveront moins d'ETM qu'en années humides si ceux-ci sont d'origine anthropique

(situé en surface) mais plus d'ETM si ceux-ci sont d'origine naturelle (Feix & Tremel-Schaub, 2005).

### Quelques éléments sur le fonctionnement de la rhizosphère

Les racines libèrent dans la rhizosphère des molécules organiques de faibles masses molaires (sucres, acides organiques tels que citrate malate..., acides aminés, phénols) et des macromolécules organiques (polysaccharides, protéines de mucilage\*) (Marschner, 1995). La libération de ces substances dans la rhizosphère influe sur la mobilité des métaux (Fig. I-13) (Mench *et al.*, 1985; Mench *et al.*, 1988; Barcelò *et al.*, 2003; Kidd *et al.*, 2009; Quartacci *et al.*, 2009).

Les principaux exsudats racinaires de poids moléculaires élevés possèdent une grande capacité à fixer et à complexer les métaux. En effet, ces macromolécules insolubles possèdent des fonctions carboxyliques et l'électro-neutralité est maintenue par des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ . Les cations métalliques ont une plus forte affinité pour ce type de site de coordination que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ , ainsi en présence de cations métalliques ils sont remplacés. Ces macromolécules peuvent donc empêcher l'absorption des cations métalliques par la plante.

Les protéines du mucilage peuvent également complexer les métaux (Morel *et al.*, 1986). Dans une étude réalisée sur le maïs, Morel *et al.* (1986) ont classé les métaux selon leur affinité pour le mucilage dans l'ordre :  $\text{Pb} > \text{Cu} \gg \text{Cd} > \text{Zn}$ . Cette substance peut limiter les transferts des métaux dans la plante, et réduire leur mobilité dans la rhizosphère (Morel, 1997).

Les racines sécrètent également des macromolécules organiques solubles, qui sont de composition proche de celle du mucilage. Elles peuvent donc complexer les métaux et augmenter cette fois leur mobilité (Mench *et al.*, 1985).

Les exsudats de poids moléculaires faibles possèdent également la capacité de complexer certains ETM (Fe, Mn, Cu, Pb et Zn) et peuvent augmenter leur mobilité.

---

\* Protéines de mucilage : Macro-molécules insolubles constituées principalement de polysaccharides contenant des acides uroniques et de protéines (Morel *et al.*, 1986; Marschner, 1995), d'aspect gélatineux qui agit comme lubrifiant en facilitant la pénétration de la racine à travers le sol durant sa phase de croissance.

La production de ces molécules dépend de l'espèce, de la variété végétale, du stade de développement de la plante et des conditions du milieu. Certains acides organiques sécrétés par les plantes comme le citrate, le malate et l'oxalate peuvent induire la dissolution de nombreux minéraux par complexation avec les cations du minéral. En effet, Jones *et al.* (1996) ont montré lors d'une étude menée en laboratoire qu'en présence de citrate ou de malate, la goethite ( $\alpha\text{FeOOH}$ ) et la ferrihydrite ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ) étaient dissoutes rapidement.

Certaines études montrent qu'une pénurie de nutriments (P, Fe) peut entraîner une libération plus conséquente de ces substances, pour permettre à la plante de s'approvisionner à partir des constituants du sol (Zhang *et al.*, 1989; Marschner, 1995; Zhuang *et al.*, 1997; Kirk *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 1999). Par exemple, en condition de déficience en Fe ou Zn, certaines graminées vont excréter des phytosidérophores (acides aminés particuliers) capables de complexer et de solubiliser le Fe, le Zn, le Cd, le Cu et le Mn (Treeby *et al.*, 1989 ; Kidd *et al.*, 2009).

#### **I.4.3.2. Conséquences sur la spéciation des contaminants métalliques**

Des études en conditions contrôlées montrent que les plantes possèdent la faculté d'altérer des phases minérales telles que les oxyhydroxydes de fer et de manganèse (voir paragraphe précédent), les carbonates (Hinsinger, 2001a), mais également d'autres minéraux relativement peu solubles tels que les phosphates (Zhuang *et al.*, 1997; Morel & Hinsinger, 1999; Hinsinger, 2001), et certains silicates qui contiennent des éléments essentiels pour la plantes (Ca, K, Mg ...).

L'altération de phases minérales conduit à la mise en solution d'une grande variété d'ions, dont des cations métalliques si le milieu est contaminé (Straczek, 2003).

Le rôle indirect des plantes est en premier lieu lié à leur nutrition. En effet, certains éléments sont absorbés par les racines et d'autres pas, ce qui crée des gradients de concentrations ioniques dans la rhizosphère, et une accumulation ou un appauvrissement de l'élément considéré au voisinage de la racine.

La conduite de culture sous serre sur sédiment de *Zea maïs*, *Brassica napus oleifera* et *Lolium perenne* permet de mettre en évidence une acidification de la solution de lessivage ainsi qu'une hausse des teneurs en Zn, Cd, Cu, Pb, Mn, Fe et du carbone organique dissous (COD) dans cette même solution (Marseille *et al.*, 2000). Pour un

sédiment support de culture de différentes espèces végétales, notamment *Salix viminalis*, la quantité de Zn percolée augmente, du fait de la dissolution de ZnS (Bert *et al.*, 2003). Ces variations sont dues à des processus rhizosphériques : aération mécanique du fait de la croissance racinaire, excrétion racinaire et activité microbienne. D'une manière générale, la teneur de composés organiques en solution augmente du fait des excrétions racinaires et de l'activité des microorganismes de la rhizosphère ; cette augmentation entraîne une mise en solution des métaux (baisse du pH) mais assure parallèlement la présence de ligands pour ces même métaux (Vauléon *et al.*, 2001). De même, pour un sédiment du nord de la France, la culture de *Festuca rubra* et *Agrostis tenuis*, accélère l'oxydation de ZnS (Panfili *et al.*, 2005). Il y a également augmentation des formes phyllosilicatées et de l'hydrotalcite ce qui laisse supposer une hausse des teneurs en Mg, Al et Si (Panfili *et al.*, 2005). En 2 ans, presque tout le ZnS est dissous et le Zn est alors immobilisé sous forme de phosphate, phyllosilicate ou hydrotalcite et des précipités noirs riches en Zn sont formés sur les racines (Panfili *et al.*, 2005). En utilisant la microscopie électronique et des outils de micro-analyses sur rayonnement synchrotron, Lanson *et al.* (2008) ont identifié ce précipité comme étant un phyllomanganate riche en Zn. Ces auteurs ont proposé que la formation de cette phase métallique à l'interface sol/racine soit un système de défense contre la toxicité métallique.

## I.5. Cd et autres métaux dans les plantes, en particulier les hyperaccumulatrices

### I.5.1. Réponse des plantes aux ETM

L'assimilation et l'homéostasie d'ions métalliques essentiels sont des processus fondamentaux pour la nutrition des plantes. L'homéostasie se définit comme la capacité d'un organisme à maintenir un état de stabilité relative des concentrations dans les différents compartiments malgré les changements de son environnement externe. Plusieurs métaux et métalloïdes, comme le Fe, Mn, Zn, Cu et Mo constituent le centre actif d'enzymes et sont, par conséquent, des éléments essentiels (Marschner, 1995). D'autres métaux comme Al, Cd, As, U, Pb, Tl, Cr, Hg, Ag et Au ne sont pas des éléments essentiels pour les plantes (Marschner, 1995). La réponse des plantes aux métaux varie dans une large gamme allant de la carence à la tolérance et à la toxicité en fonction de l'augmentation de la concentration (Fig. I-14 ; Baker & Brooks, 1989). Pour survivre, les plantes doivent avoir développé des mécanismes efficaces et spécifiques pour d'une part mobiliser les éléments essentiels et d'autre part limiter l'entrée des éléments non essentiels.

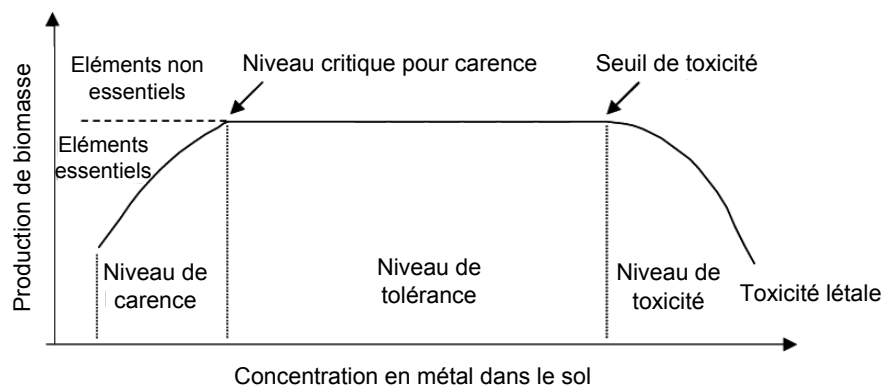


Figure I-14: Effets de la concentration en polluant métallique présent dans le sol sur la biomasse produite par les plantes (adapté de Baker & Brooks, 1989).

### I.5.2. Tolérance des plantes aux polluants métalliques

La tolérance aux métaux est définie comme étant la capacité d'une plante à survivre et se reproduire sur des milieux toxiques pour la plupart des autres plantes, en raison de la présence dans ces milieux d'un ou plusieurs métaux en concentration importante (Antonovics et al., 1971 ; Macnair & Baker, 1994).

Trois stratégies de base ont été proposées pour expliquer la tolérance des plantes aux métaux (Fig. I-15):

- 1) l'exclusion, processus par lequel les plantes limitent l'assimilation excessive et le transport de métaux,
- 2) l'indication, processus par lequel les plantes contrôlent faiblement leur assimilation en métaux, et dans ce cas, l'accumulation interne reflète la concentration trouvée dans des sols,
- 3) l'accumulation et la séquestration, processus par lesquels les plantes assimilent de grandes quantités de métaux et les transfèrent dans leurs parties aériennes où ils sont stockés (Baker, 1981). Enfin, l'hyperaccumulation se caractérise par l'accumulation de quantités exceptionnelles de métaux dans les parties aériennes des plantes, même lorsque la concentration en métaux dans le sol est faible.

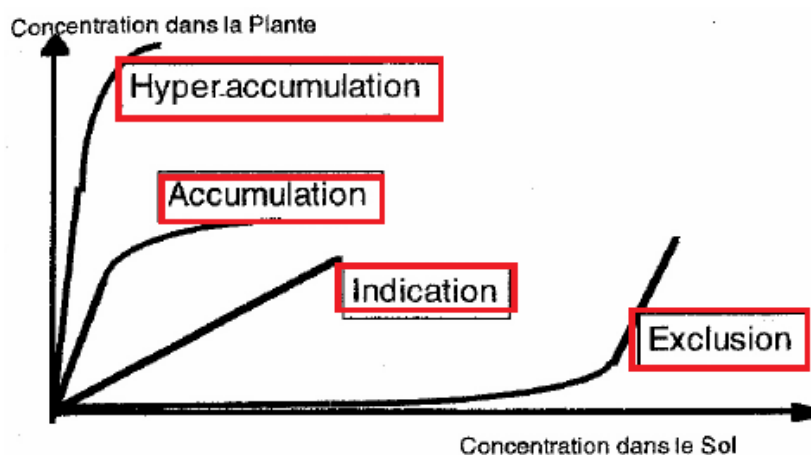


Figure I-15 : Les trois différentes stratégies de l'assimilation des métaux adoptées par les plantes en relation avec la concentration en métaux dans les sols.



### I.5.3. L'hyperaccumulation

L'hyperaccumulation est définie de plusieurs façons par les auteurs. C'est la capacité à concentrer très fortement les métaux dans les parties aériennes, au moins 10 fois plus que dans les plantes normales (Brooks, 1998). Une plante est dite hyperaccumulatrice à partir d'une concentration de 100 mg kg<sup>-1</sup> de matière sèche dans ses parties aériennes pour le Cd (soit 0.01% de leur matière sèche), 1000 mg kg<sup>-1</sup> pour Co, Cu, Cr, Ni, Pb (soit 0.1%), et 10 000 mg kg<sup>-1</sup> pour Zn et Mn (soit 1%) (Reeves & Baker, 2000) (Tab. I-5). Les plantes hyperaccumulatrices se caractérisent par un coefficient de transfert ou « shoot-root ratio » (rapport entre la concentration totale d'un élément dans les parties aériennes et la concentration totale de ce même élément dans les racines) et un facteur de bioconcentration (rapport entre la concentration totale d'un élément dans les tissus de la plante et la concentration totale de cet élément soit dans la matrice contaminée soit dans le pool labile) supérieurs à 1 (Mench et al. 2009). Elle peuvent accumuler des concentrations exceptionnelles d'ETM dans leurs parties aériennes sans symptômes de toxicité visibles (Verbruggen et al., 2009). Plus de 450 espèces de plantes (0.2 % d'angiospermes) ont été identifiées comme étant des hyperaccumulatrices de métaux (Zn, Ni, Mn, Cu, Co et Cd), de métalloïdes (As) et de « non-métaux » (Se). La majorité d'entre elles sont des hyperaccumulatrices de Ni (75 %) (Brooks *et al.*, 1977; Baker & Brooks, 1989; Reeves & Baker, 2000; Ellis & Salt, 2003; Sors *et al.*, 2005; Milner & Kochian, 2008) (Tab. I-5). L'hyperaccumulation du Zn et du Cd est principalement observée chez les *Brassicaceae*, en particulier au genre *Thlaspi* et à l'espèce *Arabidopsis halleri*.

Tableau I-5 : Plantes hyperaccumulatrices d'ETM (tableau adapté de Reeves & Baker, 2000; Bert *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004; Vogel-Mikuš *et al.*, 2005 ; Verbruggen et al., 2009).

Element trace	Seuil de concentration pour l'hyperaccumulation (% poids sec de feuilles)	Nombre de taxons	Nombre de familles
As	≥ 0.1	2	2
Cd	≥ 0.01	4	2
C	≥ 0.1	26	11
Cu	≥ 0.1	35	15
Mn	≥ 1.0	10	6
Ni	≥ 0.1	390	42
Pb	≥ 0.1	14	7
Tl	≥ 0.1	1	1
Zn	≥ 1.0	14	6

Récemment, une attention particulière a été donnée à l'hyperaccumulatrice de Zn et de Cd *Arabidopsis halleri*. Cette espèce est présente sur des sols contaminés en ETM et sur des sols non-contaminés en Europe. La tolérance au Zn est un caractère constitutif de cette plante, avec une variation quantitative mineure entre des populations locales (Pauwels et al., 2006). L'hyperaccumulation du Zn et du Cd est un caractère constitutif de cette plante indépendamment de son origine (Bert et al. 2002).

La capacité d'*A. halleri* à accumuler le Cd est variable entre des populations et au sein d'une même population (Bert et al., 2002). Les variations intraspécifiques pour l'accumulation du Cd sont considérablement supérieures à celles observées pour le Zn (Bert et al., 2002 ; Assunção et al., 2003). Bien qu'*A. halleri* puisse accumuler jusqu'à 6000 mg kg<sup>-1</sup> PS de Cd quand elle est cultivée sur solution hydroponique (Küpper et al., 2000), les plantes prélevées dans leur habitat naturel en Europe n'atteignent pas systématiquement les 100 mg kg<sup>-1</sup> de Cd dans les parties aériennes (Wenzel & Jockwer, 1999 ; Reeves & Baker, 2000 ; Bert et al., 2002).

#### **I.5.4. Mécanismes de tolérance et d'hyperaccumulation**

##### **I.5.4.1. Les bases génétiques**

Il a été montré que la tolérance et le hyperaccumulateur sont déterminés génétiquement chez les plantes (Baker et al., 1994; Meerts et Van Isacker, 1997; MacNair et al., 1999 ; Bert et al., 2003). A partir de l'analyse de croisements entre *A. halleri* × *A. lyrata* sous-espèce *petraea*, Macnair et al. (1999) ont conclu que la tolérance au Zn et l'hyperaccumulation de Zn étaient des caractères indépendants chez *A. halleri*. La même conclusion a été faite pour le cadmium dans cette espèce (Bert et al., 2003). Les progrès récents ont permis (i) l'identification de gènes potentiellement impliqués dans la tolérance au Zn et l'accumulation du Zn et (iii) l'identification des QTL (Quantitative Trait Loci, en français Locus d'intérêt Quantitatif), c'est-à-dire les régions chromosomiques associées au caractère quantitatif qu'est la tolérance au Zn (Roosens et al., 2008, Verbruggen et al., 2009). Les QTL sont détectés par analyse de co-ségrégation en établissant un lien statistique entre génotype et phénotype dans de grandes populations d'hybrides de seconde génération (F2). Ainsi, Willems et al. (2007) ont mis en évidence 3 QTL pour la tolérance au Zn. De récentes études se sont focalisées sur les gènes impliqués dans la tolérance au Cd et dans l'accumulation du Cd (Craciun et al.,

2006 ; Weber et al., 2006) Courbot et al (2007) ont trouvé 3 QTL pour la tolérance au Cd, dont un est commun avec la tolérance au Zn.

#### **I.5.4.2. Mécanismes d'hyperaccumulation**

Les étapes clés de l'hyperaccumulation sont l'assimilation des métaux du sol par les racines des plantes, la translocation des racines vers les parties aériennes, puis la séquestration des métaux dans les vacuoles ou la détoxification par chelation (Verbruggen et al., 2009).

Les mécanismes d'assimilation des métaux des plantes hyperaccumulatrices et la base de leur spécificité métallique sont encore mal compris. L'importante assimilation de métaux par des hyperaccumulateurs peut s'expliquer soit par (i) un fort taux d'absorption du métal dans les racines (Lasat et al., 1996) couplé à un fort taux de translocation du métal des racines aux parties aériennes (Shen et al., 1997; Lasat et al., 1998), soit par (ii) une grande surface d'interaction entre les racines et le sol due à un système racinaire très développé (Keller et al., 2003) et (iii) un tropisme des racines dans des régions enrichies en métaux (Schwartz et al., 1999; Whiting et al., 2000, Verbruggen et al., 2009). Actuellement, les transporteurs transmembranaires de Cd ne sont pas connus. Ce métal pourrait être transporté via les canaux de transporteurs d'autres cations comme le Zn ou Fe (Pence et al., 2000; Lombi et al., 2002). Chez *A. halleri*, la protéine de transport du Zn *MTPI* est hautement exprimée dans les racines (Dräger et al., 2004),.

Une translocation efficace d'ions métalliques vers les parties aériennes de la plante exige un passage radial symplasmique et le chargement actif dans le xylème (Clemens, 2006; Xing et al., 2008). Dans les racines, le transport de l'apoplasme vers le symplasme assure le passage de l'eau et des solutés vers le cylindre central où siègent les faisceaux conducteurs de sève contenant des ligands. Récemment, le rôle du transporteur HMA4, qui permet le passage du Zn dans le xylème, dans l'hyperaccumulation a été montré par analyse fonctionnelle (Hanikenne et al., 2008). Le besoin de ligands pour tous les ETM dans le xylème est controversé. Salt et al., (1999) ont montré que la plupart du Zn dans la sève du xylème de *T. caerulescens* étaient présents sous forme d'ions hydratés libre  $Zn^{2+}$ . De même Ueno et al. (2008) ont montré

que le Cd est principalement sous forme d'ion libre dans la sève du xylème dans *A. halleri*.

Il semble que la compartimentation des métaux dans les parties les moins actives métaboliquement de la plante joue un rôle majeur dans la tolérance et l'hyperaccumulation des métaux (Wang & Evangelou, 1995; Di Toppi & Gabbrielli, 1999 ; Verbruggen et al., 2009). Ces compartiments sont principalement les vacuoles et aussi les parois extracellulaires. Dans les vacuoles, les métaux peuvent être sous forme de complexes solubles et/ou de précipités insolubles (Wang et Evangelou, 1995).

La plupart des connaissances actuelles sur les mécanismes d'hyperaccumulation sont résumées dans la revue de Verbruggen et al. (2009). La figure I-16, extraite de cette revue, résume les différentes étapes de l'accumulation du Zn pour des plantes hyperaccumulatrices.

- La première étape, notée (I) sur la figure I-16, consiste à augmenter l'assimilation du Zn dans les cellules des racines.
- La seconde étape, notée (II) et (III) sur la figure I-16, concerne le chargement du xylème au niveau des racines, puis le déchargement au niveau des parties aériennes.
- l'étape suivante peut être soit la détoxification par chélation (notée (IV)), soit la séquestration vacuolaire (notée (V)). La détoxification par chélation peut s'effectuer via les possibles ligands du Zn présents dans le cytoplasme (histidine et nicotianamine). En ce qui concerne la séquestration vacuolaire du Zn chez *A. halleri*, le Zn est principalement stocké dans les cellules du mésophylle, sous forme de complexes Zn-acides organiques.

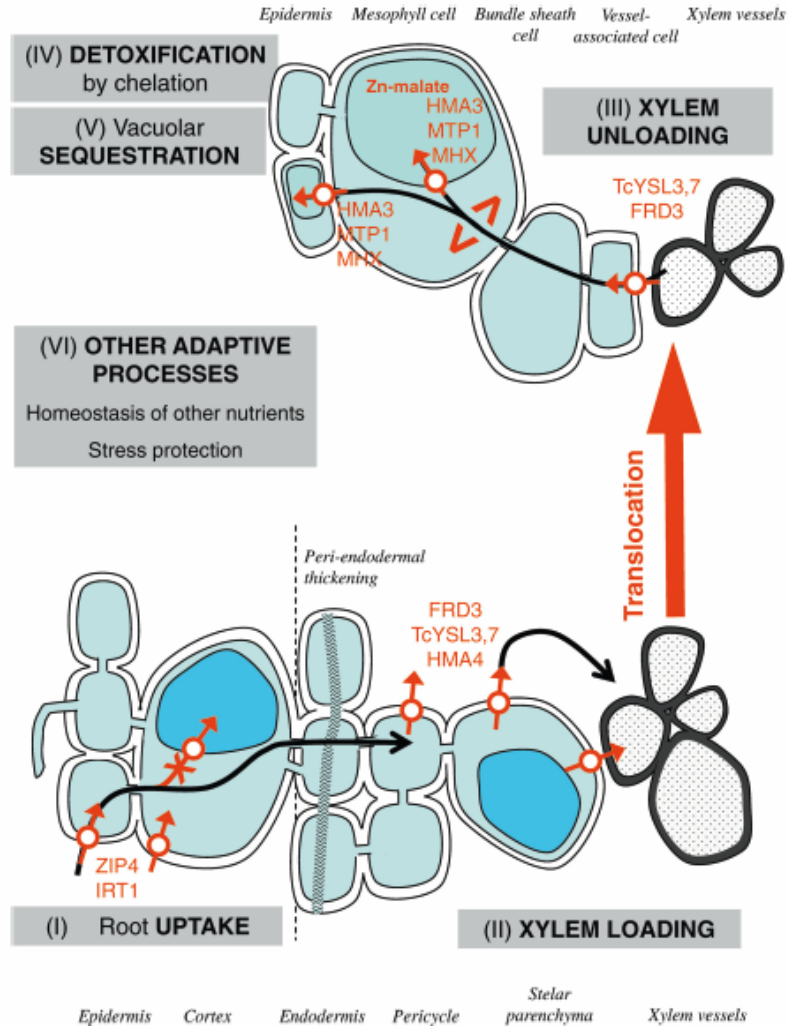


Figure I-16 : Vue d'ensemble de la compréhension actuelle des adaptations pour l'hyperaccumulation des métaux, en particulier du Zn. Sur ce schéma, les transporteurs sont indiqués en rouge (Extrait de Verbruggen et al., 2009).

#### I.5.4.3. Méthodes pour étudier la localisation et la spéciation du Cd dans les plantes

##### Localisation

L'autoradiographie permet la localisation de métaux à l'échelle de la plante entière (Crafts & Yamaguchi, 1964, Cunningham *et al.*, 1975, Cosio *et al.*, 2005, Cosio *et al.*, 2006, Page *et al.*, 2006), avec une résolution d'une dizaine de  $\mu\text{m}$ . La technique est sensible et permet l'étude de plantes faiblement exposées aux métaux. Par exemple, Cosio et al. (2005) ont été capable d'imager la distribution du Cd dans *Thlaspi caerulescens* cultivé pendant 30 jours dans  $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$  de  $^{109}\text{Cd}$ . Les auteurs ont constaté

que le Cd est principalement accumulé aux bords des feuilles et au niveau de tâches nécrotiques. À notre connaissance, il n'y a aucune étude équivalente conduite sur *A. halleri*.

A l'échelle cellulaire, la localisation peut s'effectuer via la séparation physique des compartiments (pelage de l'épiderme, isolation des protoplastes et des vacuoles (Marquès et al., 2004 ; Ma et al., 2005).

Le niveau cellulaire et les tissus peuvent être étudiés en microscopie électronique à balayage couplée avec la microanalyse X (MEB-EDS), par émission de rayons X induite par particules chargées (PIXE), ou par analyse de fluorescence sur rayonnement synchrotron ( $\mu$ XRF). Ces dernières techniques permettent la cartographie élémentaire d'une zone de quelques cm<sup>2</sup> (par exemple, une feuille) dans un temps d'acquisition raisonnable (c'est-à-dire quelques heures). La microscopie confocale à balayage laser ou l'épifluorescence qui utilise des colorants fluorescents spécifiques aux métaux (par exemple, Zinquin et Zinpyr pour le Zn) peut aussi être utilisé pour localiser des métaux à l'échelle cellulaire (Sarret et al., 2006, Peng et al., 2007, Sinclair et al., 2007, Hanikenne et al., 2008).

La localisation de métaux dans les plantes au niveau subcellulaire est généralement étudiée par la microscopie électronique par transmission couplée à la microanalyse rayon-X (MET-EDS).

### Spéciation

La forme chimique du cadmium dans différentes plantes a été étudiée par spectroscopie EXAFS, comme Salt et al. (1995) dans les feuilles de la moutarde indienne *B. juncea*, Kupper et al. (2004) dans les feuilles de *Thlaspi caerulescens*, Hokura et al. (2006) et Fukuda et al. (2008) dans les feuilles d'*A. halleri*. Ueno et al. (2005) ont utilisé la RMN <sup>13</sup>Cd pour déterminer la spéciation du Cd dans la sève xylémique de *Thlaspi caerulescens*.

La chimie analytique a également été utilisée pour doser les acides organiques, les acides aminés, les phytochélatines (PC), i.e. les ligands potentiels des métaux. Ce genre de dosage est souvent réalisé par chromatographie liquide (HPLC). Plus récemment, des techniques de chimie analytique couplées ont permis de détecter des complexes métal-ligands (eg. Poléc-Pawlak et al., 2005 ; Ouerdane et al., 2006).

#### **I.5.4.4. Connaissances actuelles sur la localisation du Cd dans les plantes**

La distribution de métaux dans les organes d'une plante et les tissus est un indicateur indirect du mode de détoxification et des mécanismes de tolérance employés par la plante. La distribution à l'échelle de la plante varie en fonction de l'espèce (Brooks et al., 1998). Par exemple, des études ont montré que les feuilles les plus jeunes de *T. caerulescens* (ecotype Vivier) et de *B. juncea* présentent des concentrations en Cd plus élevées que celles mesurées dans les feuilles plus âgées (Salt et al., 1995; Perronnet et al., 2003). En revanche, l'observation inverse a été faite pour les feuilles de *Silene vulgaris* (Chardonens et al., 1999), de *Empetrum nigrum* (Uhlig et al., 2001) et *Armeria maritima* ssp. *halleri* (Dahmani-Müller et al., 2000). Les derniers auteurs suggèrent que le transfert vers les feuilles sénescentes est un mécanisme de détoxification par exclusion lors de la chute de ces feuilles. Dans le cas du tabac, une détoxification du Cd par excrétion de grains riches en métal à l'extrémité des trichomes (poils épidermiques) a été observée (Choi et al., 2001).

La localisation et la spéciation du Cd a été aussi évaluée au niveau tissulaire, cellulaire et subcellulaire. Chez *B. juncea* et *Silene vulgaris*, l'épiderme des feuilles semble être un site majeur de l'accumulation du Cd (Salt et al., 1995; Chardonens et al., 1998), alors que chez *A. halleri* et *B. napus* la concentration la plus élevée en Cd a été mesurée dans le mésophylle (Küpper et al., 2000; Carrier et al., 2003). Dans les feuilles de *Thlaspi caerulescens*, les tissus de l'épiderme sont les plus riches en Cd (Küpper et al., 1999). Cependant, le mésophylle contient la plus grande partie du Cd présent dans la plante de par son large volume (Ma et al., 2005).

Un certain nombre d'études ont montré que la base des trichomes (poils présents à la surface des feuilles) contiennent de fortes concentrations en métaux, par exemple en Cd pour *A. thaliana* (Ager et al., 2002 ; Isaure et al., 2006) , *B. juncea* (Salt et al., 1995), et *A. halleri* (Hokura et al., 2006 ; Fukuda et al., 2008) et en Zn pour *A. halleri* (Küpper et al., 2000; Zhao et al., 2000 ; Sarret et al., 2002). Toutefois, malgré les fortes concentrations observées, ce compartiment reste la plupart du temps minoritaire en terme de stockage de métaux par rapport aux tissus des feuilles.

A l'échelle sub-cellulaire, le Cd a été localisé principalement dans les vacuoles des cellules du mésophylle des feuilles de tabac (Vögeli-Lange et Wagner, 1990). Ma et al. (2005) ont montré que 91% du Cd et 77% du Zn présents dans le mésophylle étaient

contenus dans les vacuoles. Dans le cas d'*A. halleri*, le stockage vacuolaire a été montré pour Zn mais pas pour Cd (Küpper et al., 1999). Les parois cellulaires ont été identifiées comme étant un site de stockage du Cd dans les feuilles de *Zea maïs* (Khan et al., 1984; Lozano-Rodriguez et al., 1997). Du Cd a été trouvé aussi bien dans les vacuoles que dans les parois cellulaires des feuilles de *B. napus* (Carrier et al., 2003).

#### **1.5.4.5. Connaissances actuelles sur la spéciation du Cd dans les plantes**

Les ligands potentiels des métaux dans les vacuoles sont des acides organiques (citrique, malique, oxalique, malonique, etc...), des acides aminés (histidine) et des phytates (Krämer et al., 1996; Stephan et al., 1996; Rauser, 1999; Salt et al., 1999 ; Callahan et al., 2006 ; Talke et al., 2006). La formation de complexes acides organiques/métal est possible dans l'environnement légèrement acide (pH environ 5.5) de la vacuole (Haydon & Cobbett, 2007). Des corrélations positives significatives entre le Cd total et les concentrations en Cd hydrosoluble et les concentrations en acides acétiques et citriques dans les feuilles de *S. nigrum*, une hyperaccumulatrice de Cd nouvellement découverte, ont été observées par Sun et al. (2006). Ils suggèrent que ces acides pourraient jouer un rôle dans l'hyperaccumulation du Cd. L'acide malique, présent en très forte concentration dans les feuilles, pourrait également lier Cd même si sa teneur n'est pas corrélée à celle du métal. En effet, dans le cas de Zn dans *A. halleri*, aucune corrélation n'a été observée entre acides organique et Zn (Zhao et al., 2000 ; Sarret et al., 2002), alors que ce métal est principalement complexé par ces molécules (Sarret et al., 2009).

Dans le cytoplasme, les ligands potentiels du Cd sont les methallothioneines (MT - Robinson et al., 1993) et les phytochelatines (PC; Rauser, 1990, 1995; Zenk, 1996; Rea et al., 1998 ; Schat et al., 2002)). Les phytochelatines sont une famille de peptides riches en cystéine avec la structure principale  $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$  ( $n=2\text{-}7$ ). Elles lient le cadmium par leurs groupements thiol (Pickering et al., 1999). La synthèse des PC semble être la réponse principale des plantes et de beaucoup de champignons à l'exposition au Cd et apparemment aussi pour certains animaux (Cobbett, 2000; Clemens et al., 2001, 2006; Vatamaniuk et al., 2001). Howden et al. (1995) rapporte que les PC sont essentielles pour la détoxification de Cd dans *Arabidopsis thaliana*. Les PC et leur précurseur le glutathion (GSH) pourraient être responsables de la complexation du Cd dans le cytoplasme avant son transfert dans les vacuoles (Vögeli-Lange & Wagner, 1990; Di



Toppi & Gabbrielli, 1999) et dans le transport du cadmium dans le phloème (Mendoza-Cózatl et al., 2008)

De nombreuses tentatives ont été faites pour augmenter la formation de PC chez les plantes, notamment en surexprimant des enzymes impliquées dans la synthèse du GSH. Dans quelques cas, cela a mené à une augmentation légère de la tolérance au Cd et de l'accumulation (Zhu et al., 1999), alors que dans d'autres cas, il ne s'est rien produit (Xiang et al., 2001; Lee et al., 2003). Chez les hyperaccumulatrices, comme pour les non-hyperaccumulatrices, les PC sont principalement produites en réponse au Cd dans les racines (pour *T. caerulescens* et *S. Alfredii* - Schat et al., 2002 ; Sun et al., 2007).

Les études sur la spéciation du Cd dans les feuilles ont montré que les ligands sont différents dans chaque compartiment de la plante et qu'il n'y a pas un ligand mais plusieurs ligands dans différentes proportions. Salt et al. (1995), qui ont étudié les différents complexes formés avec le Cd dans la moutarde indienne, *B. juncea*, ont montré que le Cd présent sous la forme d'un complexe Cd-PC contient 4 ligands S, alors que dans la sève du xylème, le Cd est coordonné à 6 ligands O/N. Les travaux de Kupper *et al* (2004) sur les feuilles de *Thlaspi caerulescens* d'origine métallicole, cultivées en hydroponie pendant 6 mois en présence de Cd et de Zn, ont aussi mis en évidence la présence de Cd-S et Cd-O/N pour des distances interatomiques respectives de 2,51 et 2,28 Å. Kupper et al. (2004) ont montré que la spéciation du Cd dans les feuilles de *T. caerulescens* varie en fonction de la teneur en Cd dans la solution hydroponique et que la présence de ligands S augmente avec l'augmentation de la teneur en Cd dans la solution hydroponique. Les auteurs ont aussi montré qu'il n'y avait pas de différence de spéciation du Cd dans les feuilles jeunes et matures, alors que le Cd est sous une forme différente dans les feuilles sénescents. Dans chacune des feuilles étudiées, Kupper et al. (2004) ont identifié du Cd associé à de l'histidine.

La spéciation du Cd a été étudiée par RMN  $^{13}\text{Cd}$  dans la sève du xylème des feuilles d'*A. halleri* par Ueno et al. (2008). Ces derniers ont montré que le Cd est principalement transporté sous forme d'ions libres et les ligands potentiels du Cd incluent citrate, histidine, cystéine, glutathion et nicotianamine. Fukuda et al. (2008) ont étudié la spéciation du Cd dans les vacuoles des trichomes d'*A. halleri* par analyses  $\mu$ -XANES et ont montré que dans ces cellules particulières la majorité du Cd est à l'état divalent et qu'il est associé à des ligands O ou N.

## I.6. Conclusion bibliographique

L'état de l'art met clairement en évidence le faible nombre d'études qui concernent les sédiments de curage et l'impact de plantes hyperaccumulatrices, et en particulier de *A. halleri*, sur ce type de matrice. Le premier objectif de ce travail est d'étudier le système « plante/sédiment contaminé » afin d'évaluer si *A. halleri* peut se développer sur ce type de matrice, puis d'évaluer le transfert du Cd dans la plante et quantifier l'accumulation du Cd dans ses parties aériennes.

Le développement des plantes a un impact sur la spéciation des métaux. Cet impact est difficilement prévisible car l'activité des plantes induit des effets multiples et souvent interdépendants : modifications du pH, du potentiel redox et des concentrations ioniques, exsudation de substances organiques, augmentation de l'activité des micro-organismes ... L'effet global des plantes sur la spéciation des métaux, et donc sur leur mobilité, résulte de tous ces phénomènes. Le second objectif de ce travail est de préciser l'impact de la culture d'*A. halleri* sur la spéciation, ainsi que sur la localisation du Cd dans le sédiment à l'échelle moléculaire en déterminant les transformations géochimiques du Cd. L'impact d'*A. halleri* sur les pools échangeable et phytodisponible en Cd à l'échelle macroscopique ainsi que sur le Cd contenu dans les lixiviats sont aussi étudiés.

Depuis quelques années, *A. halleri* est étudiée pour sa tolérance au Zn et au Cd et pour l'accumulation de ces métaux. Les études menées sur la localisation du Cd à l'échelle tissulaire, cellulaire, subcellulaire, ont montré que le Cd était principalement présent dans l'épiderme, les cellules du mésophylle et notamment dans les vacuoles de ces cellules, les trichomes (poils épidermiques) et les parois cellulaires. A l'échelle de la rosette, une étude de la localisation a été réalisée sur *Thlaspi caerulescens*. La littérature met en évidence le manque de données concernant les mécanismes de l'accumulation, la localisation et la forme chimique du Cd dans les parties aériennes de *A. halleri*.

Il existe encore peu de données sur les différentes étapes de l'hyperaccumulation de Cd dans *A. halleri*, à savoir l'assimilation par les racines, la translocation des racines vers les parties aériennes, puis la séquestration vacuolaire et/ ou la détoxification par chélation dans le cytoplasme. La spéciation du Cd a été étudiée chez *Thlaspi caerulescens*, et le Cd est associé à des ligands O lors de la séquestration vacuolaire.

Lors de la détoxification par chélation, il est plutôt associé à des ligands soufrés, comme les phytochélatines et le glutathion, peptide précurseur des phytochélatines ou encore à l'histidine.

Le troisième grand objectif de ce travail est de préciser les mécanismes de stockage du cadmium dans *A. halleri* à l'échelle macroscopique, microscopique et moléculaire en étudiant la localisation et la distribution du Cd au sein de la rosette et de la feuille, ainsi que la compétition avec le Zn qui est également hyperaccumulé par *A. halleri*, puis la spéciation du Cd dans les parties aériennes de *A. halleri* et les différents ligands possibles (acides organiques, acides aminés et phytochélatines).

L'objectif finalisé de ce projet est d'accroître les connaissances concernant l'accumulation du Cd chez l'hyperaccumulateur *A. halleri*, pré-requis indispensable au transfert technologique de la phytoextraction.



# Chapitre II

**Suivi macroscopique de la culture  
d'*A. halleri* sur sédiment  
&  
Impact de cette culture sur la  
spéciation et la localisation du Cd  
présent dans le sédiment.**

# Sommaire

## CHAPITRE II : SUIVI MACROSCOPIQUE DE LA CULTURE D'A. HALLERI SUR SEDIMENT ET IMPACT DE CETTE CULTURE SUR LA SPECIATION ET LA LOCALISATION DU Cd PRESENT DANS LE SEDIMENT ..... 91

### II.1. MATERIEL ET METHODES ..... 93

#### II.1.1. LE SEDIMENT ..... 93

##### II.1.1.1. Prélèvement et conditionnement du sédiment..... 93

#### II.1.2. PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ..... 95

##### II.1.2.1. Composition granulométrique..... 95

##### II.1.2.2. Mesure des paramètres physico-chimiques ..... 95

##### II.1.2.3. Concentration pseudo-totale en éléments majeurs et traces du sédiment initial et des fractions granulométriques..... 96

#### II.1.3. CARACTERISTIQUES DU SEDIMENT ..... 97

#### II.1.4. MATERIEL VEGETAL ..... 101

#### II.1.5. MISE EN CULTURE ET CONCEPTION DE L'EXPERIENCE ..... 104

##### II.1.5.1. Mise en culture ..... 104

##### II.1.5.2. Détail du suivi macroscopique : description des analyses réalisées ..... 106

#### II.1.6. ETUDE DE LA SPECIATION AVANT ET APRES CULTURE DU Cd PRESENT DANS LE POT ..... 109

##### II.1.6.1. Préparations des échantillons..... 109

##### II.1.6.2. Identification des phases porteuses individuelles ..... 111

##### II.1.6.3. Détermination de la spéciation et quantification des espèces chimiques : techniques de spectroscopies d'absorption des rayons X..... 113

### II.2. SUIVI MACROSCOPIQUE DE LA PLANTE ET DU SEDIMENT LORS DE LA CULTURE :

#### RESULTATS ..... 121

#### II.2.1. PARAMETRES DE CROISSANCE DES PLANTES ..... 121

#### II.2.2. ACCUMULATION DU Cd ET DU Zn DANS LES PARTIES AERIENNES DES PLANTES ..... 122

#### II.2.3. SUIVI DU SEDIMENT ..... 126

##### II.2.3.1. pH et carbone total ..... 126

##### II.2.3.2. Concentration pseudo-totales en métaux dans le sédiment..... 127

##### II.2.3.3. Concentrations en métaux et sulfates dans les lixiviats ..... 127

##### II.2.3.4. Biodisponibilité des métaux ..... 130

#### II.2.4. DISCUSSION ..... 135

##### II.2.4.1. Paramètres de croissance des plantes..... 135

##### II.2.4.2. Accumulation du Cd et du Zn dans les parties aériennes de la plante..... 137

##### II.2.4.3. Biodisponibilité des métaux ..... 139

##### II.2.4.4. Bilan de matière..... 140

### II.3. CARACTERISATION DE LA SPECIATION ET DE LA LOCALISATION DU Cd DANS LE SEDIMENT APRES CULTURE ..... 146

#### II.3.1. ETUDE DES SPECTRES DE COMPOSES MODELES ..... 146

##### II.3.1.1. Spectres EXAFS au seuil K de Cd ..... 146

##### II.3.1.2. Spectres XANES au seuil L<sub>III</sub> de Cd ..... 151

##### II.3.1.3. Spectres XANES de S ..... 152

II.3.2. SPECIATION DU CD DANS LE SEDIMENT AVANT CULTURE .....	153
II.3.2.1. Détermination de la spéciation moyenne de Cd .....	153
II.3.2.2. Détermination des espèces individuelles du Cd sur le sédiment préparé: micro-analyses.....	160
II.3.2.3. Spéciation dans le sédiment initial avant culture : bilan .....	166
II.3.3. SPECIATION DU SEDIMENT APRES CULTURE .....	167
II.3.3.1. Détermination de l'espèce moyenne du Cd présent dans le sédiment après culture .....	167
II.3.3.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : simulation numérique.....	171
II.3.3.3. Identification des phases porteuses individuelles de Cd présent dans le sédiment après culture : Analyses SEM-EDS, $\mu$ XRF et $\mu$ XANES .....	174
II.3.3.4. Spéciation dans le sédiment après culture : bilan .....	186
II.3.3. DISCUSSION .....	188
II.3.3.1. Spéciation dans le sédiment avant culture .....	188
II.3.3.2. Spéciation dans le sédiment après culture .....	190





## **CHAPITRE II : SUIVI MACROSCOPIQUE DE LA CULTURE D'*A. HALLERI* SUR SEDIMENT ET IMPACT DE CETTE CULTURE SUR LA SPECIATION ET LA LOCALISATION DU Cd PRESENT DANS LE SEDIMENT**

Dans ce chapitre de thèse on se propose d'étudier le système : « plante/sédiment contaminé » afin d'évaluer le transfert de Cd dans la plante et de préciser l'impact de la culture d'*A. halleri* sur le sédiment. Pour le premier volet, nous avons suivi la croissance des plantes et les éventuels signes de toxicité, ainsi que l'accumulation du Cd et d'autres métaux dans les parties aériennes. Le zinc a été particulièrement suivi car il est généralement 10 à 100 fois plus concentré dans les sols que le Cd, et il est également hyperaccumulé par *A. halleri* ; d'éventuels effets de compétition pour l'entrée des métaux dans la plante pourraient donc exister. Pour le second aspect, l'étude a porté sur la composition et les caractéristiques physico-chimiques de la phase solide et de la solution du sol, sur la spéciation et la biodisponibilité du Cd et Zn dans le sédiment ainsi que sur la lixiviation de ces métaux. Pour cela nous avons étudié le sédiment avant, pendant et après culture, et nous l'avons comparé à un témoin non végétalisé.

*A. halleri* est une plante pseudo-métallophyte, c'est-à-dire qu'elle développe naturellement des populations métallicoles et non-métallicoles (Bert et al., 2002). La comparaison de ces deux origines semble intéressante car les plantes d'origines métallicole et non-métallicole pourraient avoir des réponses aux métaux différentes. Nous avons donc souhaité étudier l'influence de l'origine de la plante (site contaminé ou non) sur les paramètres suivis, en comparant des plantes provenant de deux origines.

Les différents aspects étudiés dans ce chapitre reposent sur une expérience de culture en pot, en conditions contrôlées, de *A. halleri* d'origine métallicole (MET) et non-métallicole (N-MET) sur du sédiment contaminé provenant d'un curage. L'expérience a été menée sur une période de cinq mois et un suivi mensuel de nombreux paramètres pour les différentes matrices (sédiment, plante et lixiviat) a été réalisé (Fig. II-0). L'étude du système « plante/sédiment contaminé » combine des approches physiques, physico-chimiques et physiologiques et met en œuvre une palette d'outils à des échelles différentes (macroscopique, microscopique et moléculaire).

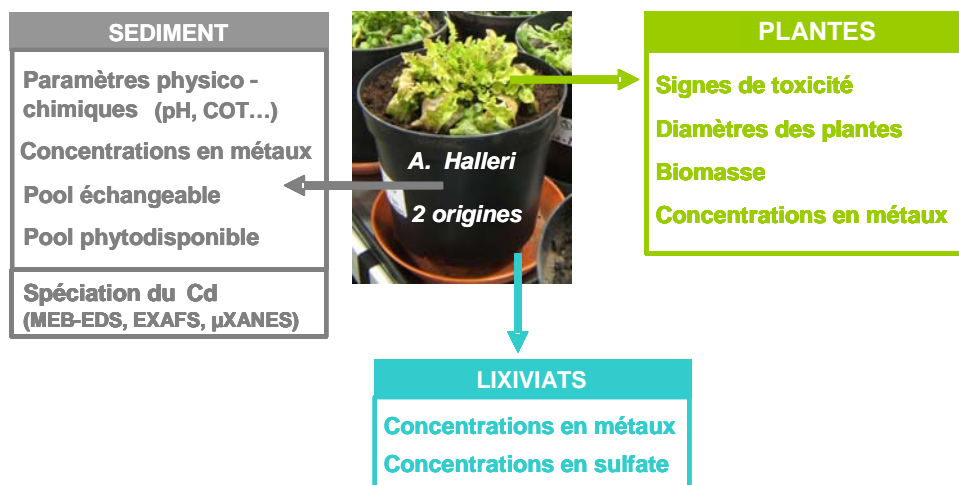


Figure II-0: Schéma récapitulatif des paramètres de suivi en fonction des matrices étudiées. Chaque analyse est faite en triplicat au minimum, excepté pour l'étude de spéciation.

## **II.1. Matériel et méthodes**

### **II.1.1. Le sédiment**

#### **II.1.1.1. Prélèvement et conditionnement du sédiment**

Le sédiment utilisé pour cette étude a été prélevé dans une portion du lit de la Scarpe inférieure, rivière du Nord de la France (Département 59 – à environ 30 km au sud de Lille). Cette région porte l'héritage d'une des plus fortes industrialisations d'Europe qui a débuté au début du XX<sup>ème</sup> siècle. La transformation et le traitement des métaux non ferreux ont libéré de grandes quantités de particules de minerai et des scories dans l'environnement (Thiry et al., 2002 ; Sterckeman et al., 2000, 2002 ; Diyab et al., 2003 ; Cuny et al., 2004 ; Gao et al., 2006 ; Deram et al., 2007, Douay et al., 2008). De plus, la Scarpe traverse un secteur très urbanisé, et reçoit aussi les émissions et les effluents des autres industries et des activités humaines. Les métaux sont accumulés dans les sédiments de la Scarpe et présentent des concentrations variables selon les zones de prélèvement (par exemple : de 2 à 643 mg kg<sup>-1</sup> Cd PS (poids sec) et de 138 à 9847 mg kg<sup>-1</sup> Zn PS - Alary & Demougeot-Renard, 2008). Pour cette étude, un secteur connu pour contenir autour de 150 kg mg<sup>-1</sup> Cd PS (Alary, 2001) a été choisi pour le curage du sédiment. Il est situé au niveau de l'écluse de Lallaing, en aval du Godion (affluent de la Scarpe) (Fig. II-1A). 550 kg de sédiment ont été prélevés, sur une longueur de berge de 400m, entre les PK 67 et 71, par grattage de surface en rive gauche à l'aide d'une pelle mécanique (Fig. II-1B). Le curage a été réalisé par VNF (Voie Navigable de France) à la fin du mois de décembre 2005.



Figure II-1 : (A) Carte de la zone de curage. (B) Opération de curage

Une fois prélevé, le sédiment a été mélangé. Une partie du sédiment a été conservée dans un bac sous eau (conservation en anoxie). Tout au long du document, ce sédiment est nommé « **sédiment initial** ». L'autre partie du sédiment a été étalée sur une bâche de façon à obtenir une couche de 20 cm d'épaisseur, et laissée à sécher pendant 7 mois en extérieur. Après cette période, le sédiment a été concassé et homogénéisé mécaniquement à l'aide d'un chariot élévateur, d'une bétonnière et d'un quarteur ainsi que manuellement (Fig. II-2), puis broyé à 5mm (broyeuse à fléaux - broyeuse à fléaux de marque RETSCH type SK). Il a été conditionné dans des sacs plastiques scellés de 5 kg et conservé dans un container. Ce sédiment est nommé « **sédiment préparé** » dans le document.



Figure II-2 : Homogénéisation du sédiment

## II.1.2. Protocoles expérimentaux

### II.1.2.1. Composition granulométrique

Un échantillon de sédiment préparé a été mis en suspension dans de l'eau déminéralisée et dispersé par passage aux ultrasons. La répartition granulométrique a ensuite été obtenue par tamisage par voie humide sur tamis en nylon d'ouverture de maille : 2mm, 500, 200 et 50  $\mu\text{m}$  (Fig. II-3). Les différentes fractions inférieures à 50  $\mu\text{m}$  (2-50  $\mu\text{m}$  et la fraction inférieure à 2  $\mu\text{m}$ ) ont été obtenues par centrifugation et sédimentation dans une colonne d'eau, d'après la loi de Stokes. Chaque fraction ainsi séparée est séchée à 40°C en étuve. Un fractionnement à 0,2  $\mu\text{m}$  a été réalisé afin d'isoler spécifiquement les minéraux argileux. Cette séparation a été effectuée par centrifugation en continu de la fraction <2  $\mu\text{m}$  du sédiment.



Figure II-3 : Opération de tamisage par voie humide

Rappelons la désignation pédologique de chaque fraction granulométrique :

- inférieure à 2  $\mu\text{m}$  : argiles granulométriques
- 2 à 50  $\mu\text{m}$  : limons fins
- 50 à 200  $\mu\text{m}$  : sables fins
- 200 à 2000  $\mu\text{m}$  : sables grossiers

### II.1.2.2. Mesure des paramètres physico-chimiques

L'humidité relative du sédiment préparé a été mesurée selon l'adaptation de la norme internationale ISO 11465 (1993) pour les sols. Les échantillons de sédiments ont été séchés jusqu'à masse constante à 105°C  $\pm$  5°C. La différence de masse d'une quantité

de sédiment donnée avant et après le processus de séchage sert de mesure pour la teneur en matière sèche et en eau. La teneur en eau est exprimée en pourcentage de masse.

Pour les analyses suivantes, les échantillons de sédiment ont été séchés à l'étuve à 40°C, puis tamisés (< 100 µm).

La détermination du pH a été réalisée selon la norme internationale ISO 10390. Cette mesure s'effectue à partir d'une suspension de sédiment préparé dans cinq fois son volume d'eau pure. A l'aide d'un agitateur magnétique, la suspension a été mélangée pendant cinq minutes. Le pH a été mesuré à l'aide d'un pHmètre (Consort C 832) au minimum deux heures après l'arrêt de l'agitation.

L'analyse du Carbone Total ( $C_{TOT}$ ) a été réalisée avec un COTmètre (OCD 5000A Shimadzu). Les échantillons ont été introduits dans un four à 900°C, sous flux d'oxygène. Le  $CO_2$  dégagé lors de la combustion a été dosé par infrarouge, par comparaison de l'absorbance de l'échantillon avec une courbe d'étalonnage réalisée avec du glucose.

D'autres paramètres tels que la teneur en carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ), en matière organique (MO), la capacité d'échange cationique (CEC), les cations échangeables ont été mesurés par le Laboratoire d'Analyses des Sols (LAS – INRA Arras, Fr.) selon les normes AFNOR en vigueur.

#### **II.1.2.3. Concentration pseudo-totale en éléments majeurs et traces du sédiment initial et des fractions granulométriques**

La méthode utilisée dérive de la norme NF X 31-151 fixée pour l'analyse des métaux dans les sols, sédiments et boues de station d'épuration, la méthode consiste en premier lieu en une minéralisation dite pseudo-totale à l'eau régale avec un four à micro-ondes dans un réacteur fermé. Après séchage en étuve à 40°C, un aliquote de 0,5 g de sédiment a été broyé et tamisé à 100 µm. L'attaque à l'eau régale a été réalisée dans un réacteur en téflon (XP-1500 plus, Content under pressure - CEM) en additionnant à l'échantillon de sédiment broyé 1ml d'eau MilliQ®, 2,5 ml d'acide nitrique ( $HNO_3$  65%) et 6,5 ml d'acide chlorhydrique ( $HCl$  37%). Un blanc et un sédiment témoin en

duplicat (TH2- National Water Research Institute – Environment Canada), dont les concentrations en métaux sont connues, sont présents dans chaque cycle de minéralisation. Les échantillons ont été laissés à 180°C pendant 20 minutes à une puissance de 1200 W (four micro-ondes MARSX - CEM). Un temps de refroidissement de 40 minutes a permis la baisse de la température et de la pression évitant la dispersion des métaux volatils.

Le minéralisat a ensuite été filtré (filtre Whatman® 2V 150mm de diamètre filtrant, porosité 0,45 µm) et ramené à 100 ml avec de l'eau MilliQ®. Le dosage des métaux contenus dans la solution a été réalisé par spectrométrie d'émission utilisant un plasma : ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry – Varian). L'ICP-AES est un appareil qui permet une analyse multi-élémentaire des teneurs en éléments majeurs (Al, Mg, Fe,...) et en éléments traces métalliques (ETM). La technique d'émission atomique, mesure l'énergie libérée par un atome sous forme d'un photon de fréquence  $\nu$  transportant l'énergie  $h\nu$ . L'échantillon ainsi dissocié en atomes ou ions libres va se retrouver excité par le plasma. Le retour à l'état fondamental des atomes provoque une émission d'énergie dont la longueur d'onde est spécifique à chaque élément émetteur, et directement proportionnelle à sa concentration. Cette technique ne renseigne pas sur la forme chimique des éléments présents dans l'échantillon.

### **II.1.3. Caractéristiques du sédiment préparé**

Les principales caractéristiques du sédiment sont données dans les tableaux II-1 et II-2.

L'humidité relative est de 20% (Tab. II-1). Cette dernière valeur a été prise en compte dans le calcul définissant la capacité au champ pour l'expérience de culture de *A. halleri* sur sédiment, décrite ultérieurement.

Le sédiment est un substrat carbonaté présentant un pH neutre à légèrement alcalin ( $7.48 \pm 0.01$ , tab. II-1). Il est relativement riche en matière organique ( $10.5 \pm 0.2$  % de carbone total et  $22.5 \pm 0.1$  % de matière organique, tab. II-1). La capacité d'échange cationique est élevée (CEC :  $25.4 \pm 0.5$  cmol(+) kg<sup>-1</sup>), ce qui est en accord avec les fortes teneurs en matière organique et argiles (Fig. II-4)

Tableau II-1 : Principales caractéristiques du sédiment. Moyenne et écart-type réalisés sur 3 échantillons.

Paramètres physico-chimiques du sédiment			
Humidité relative	%	20 ± 1	(3)
CaCO <sub>3</sub> (total)	%	7.2 ± 0.2	(3)
pH, H <sub>2</sub> O		7.48 ± 0.01	(3)
C <sub>TOT</sub>	%	10.5 ± 0.2	(3)
MO	g kg <sup>-1</sup>	225 ± 1.3	(3)
CEC (Metson)	cmol(+) kg <sup>-1</sup>	25.4 ± 0.5	(3)
K (K <sub>2</sub> O) échangeable	g kg <sup>-1</sup>	0.24 ± 0.02	(3)
Mg (MgO) échangeable	g kg <sup>-1</sup>	0.599 ± 0.003	(3)
Ca (CaO) échangeable	g kg <sup>-1</sup>	15.47 ± 0.06	(3)
Na (Na <sub>2</sub> O) échangeable	g kg <sup>-1</sup>	0.205 ± 0.003	(3)
P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Olsen	g kg <sup>-1</sup>	0.227 ± 0.003	(3)

La figure II-4 présente les différents pourcentages massiques de chaque fraction granulométrique isolée. Les fractions fines sont majoritaires. En effet, la fraction dont la granulométrie est inférieure à 50µm représente 70% de l'échantillon initial de sédiment, et le sédiment est limoneux-argileux (environ 20% - Fig. II-4).

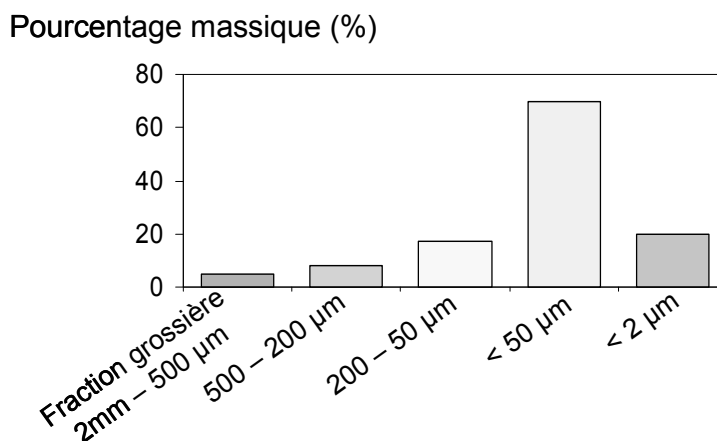


Figure II-4 : Pourcentage massique de chaque fraction granulométrique constituant le sédiment.

La fraction grossière a été observée à la loupe binoculaire. Cette observation a permis d'isoler différents types de grains :



- des grains noirs, poreux, opaques qui présentent parfois des traces marron à rougeâtres. Ces grains incluent des scories sphériques vitreuses,
- des grains noirs brillants, souvent des charbons et des charbons gras,
- des grains vitreux colorés, parfois translucides et de teintes variées (vert, jaune, bleu, gris),
- des grains rouges, éclats de brique,
- des grains blancs, constitués essentiellement de grains de quartz et de carbonates comme des coquilles,
- des débris organiques, composés essentiellement de débris végétaux et parfois des membres fossiles d'insectes tels que des ailes,
- des grains bulleux, ayant l'aspect d'un amoncellement de sphères cristallisées,
- et les grains dits « amalgames », qui sont des agrégats de particules fines.

Le sédiment contient des teneurs en Cd et Zn d'environ 140 mg kg<sup>-1</sup> et 4000 mg kg<sup>-1</sup> respectivement (Tab. II-2). Ces valeurs de concentration sont nettement supérieures aux valeurs du fond géochimique des sédiments régionaux qui sont de 0,5 mg kg<sup>-1</sup> et 75 mg kg<sup>-1</sup> respectivement (données de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, 2002). Le tableau II-2 montre également des concentrations élevées en autres métaux et métalloïdes (Pb, Cu, As).

Tableau II-2 : Concentration en cations majeurs et ETM contenu dans le sédiment avant culture. Moyenne et écart-type réalisés sur 10 échantillons.

Concentrations élémentaires dans le sédiment			
Al	mg kg <sup>-1</sup>	20759 ± 2846	(10)
Ca	mg kg <sup>-1</sup>	43137 ± 1116	(10)
Fe	mg kg <sup>-1</sup>	21619 ± 1230	(10)
K	mg kg <sup>-1</sup>	4223 ± 577	(10)
Mg	mg kg <sup>-1</sup>	3449 ± 144	(10)
Mn	mg kg <sup>-1</sup>	304 ± 7	(10)
Na	mg kg <sup>-1</sup>	544 ± 65	(10)
P	mg kg <sup>-1</sup>	2753 ± 88	(10)
Cd	mg kg <sup>-1</sup>	141 ± 24	(10)
Zn	mg kg <sup>-1</sup>	4074 ± 280	(10)
Cu	mg kg <sup>-1</sup>	233 ± 9	(10)
Pb	mg kg <sup>-1</sup>	600 ± 20	(10)
Ni	mg kg <sup>-1</sup>	48 ± 2	(10)
As	mg kg <sup>-1</sup>	57 ± 4	(10)

Rappelons que le curage du sédiment a été effectué dans une zone où le sédiment présente des concentrations en Cd et autres métaux, relativement élevées. Ce choix de concentration est principalement dû aux limites de détection des outils utilisés pour la caractérisation du sédiment. Par exemple, l'obtention de spectres EXAFS de bonne qualité nécessite des teneurs en métaux supérieures ou proches de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  pour ce type de matrice.

Les concentrations en Cd dans chaque fraction granulométrique ont été mesurées par dosage ICP-AES (Figure II-5). Les concentrations les plus élevées sont mesurées dans la fraction  $< 2 \mu\text{m}$  ( $290 \pm 1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Les concentrations en Cd pour les autres fractions sont inférieures d'un facteur 2 au minimum.

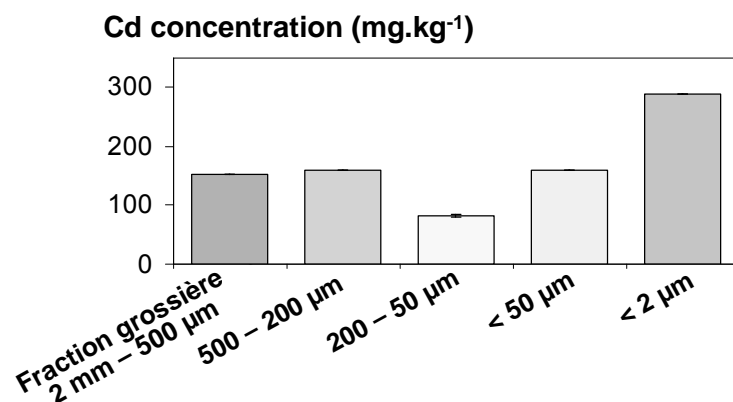


Figure II-5 : Concentration en Cd pour chaque fraction granulométrique constituant le sédiment (moyenne et écart type effectués sur des triplicats).

La figure II-6 montre que la majorité du Cd est associée aux particules fines. En effet, le Cd est présent à 72% dans la fraction  $< 50\mu\text{m}$  dont 37% dans la fraction  $< 2\mu\text{m}$ . En revanche pour toutes les autres fractions, les pourcentages de distribution du Cd sont inférieurs à 10%.

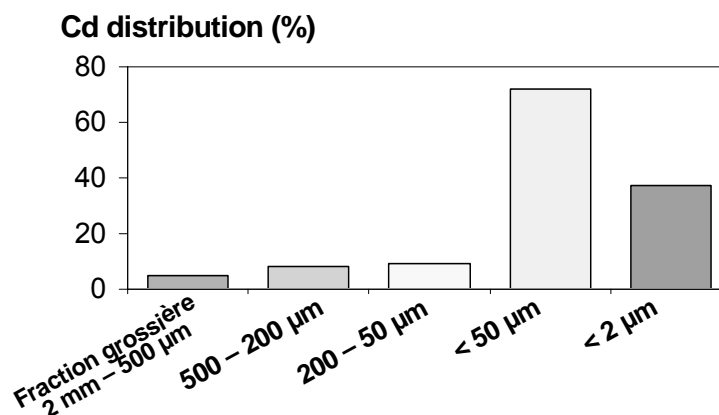


Figure II-6 : Distribution du Cd pour chaque fraction granulométrique.

#### II.1.4. Matériel végétal

Les graines de *A. halleri* d'origine métallicole (MET) ont été récoltées sur des plantes provenant d'un sol contaminé par les différentes activités des fonderies environnantes : le Bois des Asturies à Auby (59 – France, fig. II-7A, -7B, -7C). Les graines des plantes d'origine non métallicole (N-MET) ont été récoltées sur des plantes provenant d'un sol non contaminé : le parc naturel des Hautes Fagnes en Belgique (Fig. II-7E, -7F). Les graines ont été récoltées lors de différentes campagnes au cours des mois de juin et juillet 2005 et 2006.

Le sol du Bois des Asturies a été caractérisé dans plusieurs études (Bert et al., 2000 ; Cuny et al., 2004 ; Sarret et al., 2004 ; Pauwels et al., 2006). Les données de Sarret et al. (2004) sont présentées dans le Tableau II-3. Par contre, le sol des Hautes Fagnes n'est pas bien documenté. Des échantillons de sol de surface (0-20 cm de profondeur) ont été prélevés à la tarière, puis caractérisés selon les méthodes décrites pour le sédiment (Tab. II-3).

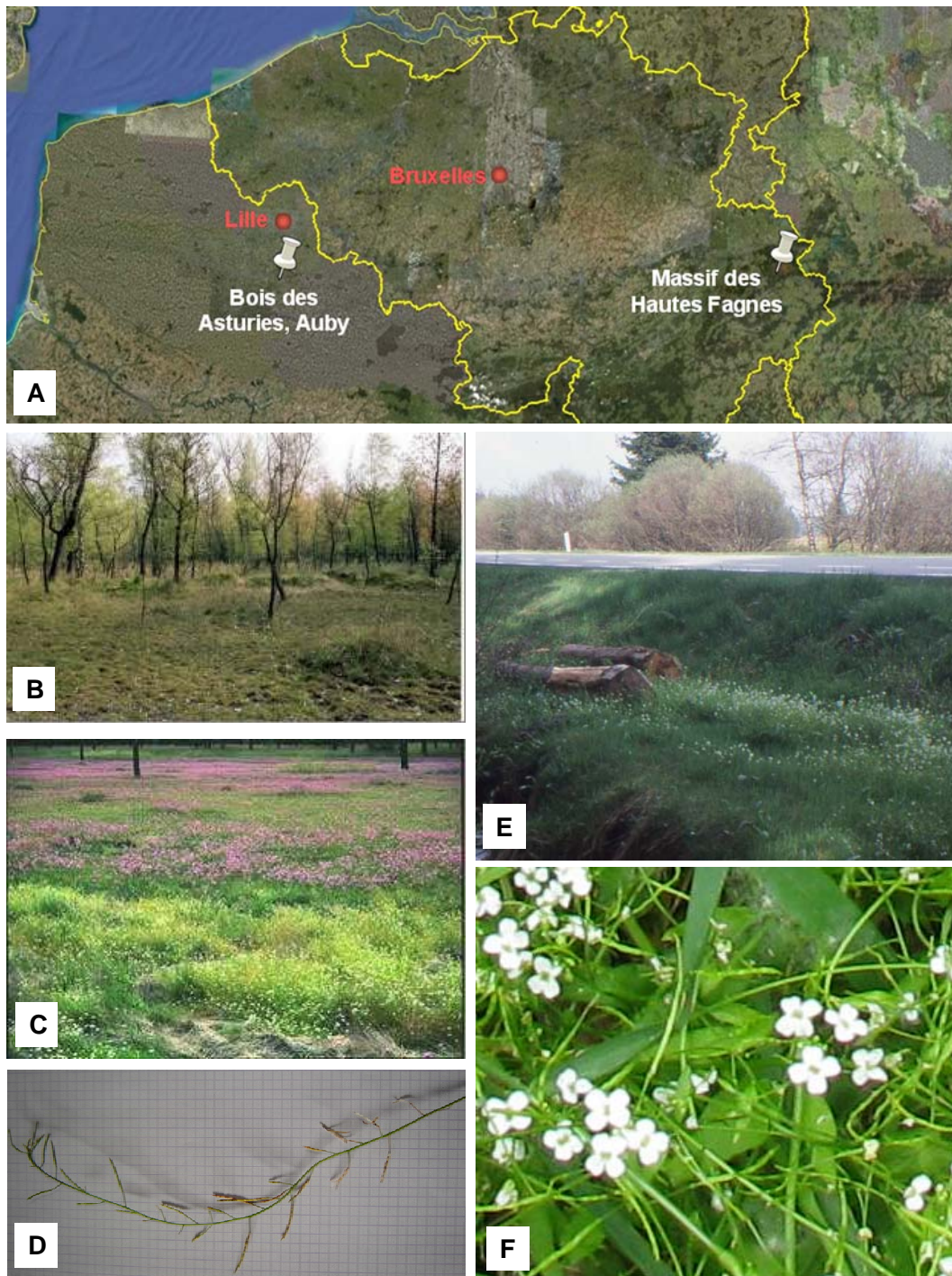


Figure II-7 : (A) Localisation des sites de prélèvement des graines. (B, C) Bois des Asturies en automne-hiver (B) et printemps (C). (D) Siliques contenant les graines. (E) Populations d'*A. halleri* en bordure de route dans le Massif des Hautes Fagnes au printemps. (F) Population d'*A. halleri* des Hautes Fagnes en fleur.

Ces deux sols présentent des caractéristiques communes comme la distribution granulométrique et le pH. Ils sont principalement composés de particules fines (Tab. II-3) et présentent un pH proche de la neutralité pour le sol des Hautes Fagnes et plus acide pour le sol d'Auby (Tab. II-3). Les concentrations en Cd et Zn pour Auby sont 300 et 239 fois plus élevées respectivement que celles mesurées dans le sol des Hautes Fagnes (Tab. II-3). En plus de cette différence majeure de concentrations en métaux, ces deux sols diffèrent également par leur teneur en matière organique (MO) et la CEC. En effet, le sol d'Auby est plus riche en MO et présente une CEC plus élevée que le sol des Hautes Fagnes (Tab. II-3).

Tableau II-3 : Principales caractéristiques du sol contaminé d'Auby (Fr) et du sol non contaminé des Hautes Fagnes (Be). Mesures réalisées sur (n) échantillons.

Caractérisation de sol			sol des Hautes Fagnes		sol d'Auby (Sarret et al., 2004)
Argiles	< 2 $\mu\text{m}$	%	19	(1)	<div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> 54 </div>
Limons	2 $\mu\text{m}$ - 50 $\mu\text{m}$	%	64	(1)	
Sables	50 $\mu\text{m}$ - 2 mm	%	17	(1)	
CaCO <sub>3</sub> (total)		%	0.3	(1)	46
TC		%	9.16 $\pm$ 0.9	(3)	
pH, H <sub>2</sub> O			6.94 $\pm$ 0.05	(3)	6.2
MO		g kg <sup>-1</sup>	278	(1)	403
CEC Metson		cmol(+) kg <sup>-1</sup>	29.5	(1)	52.7 $\pm$ 1.6*
K (K <sub>2</sub> O) échangeable		g kg <sup>-1</sup>	0.18	(1)	0.985 $\pm$ 0.004*
Mg (MgO) échangeable		g kg <sup>-1</sup>	0.15	(1)	1.123 $\pm$ 0.011*
Ca (CaO) échangeable		g kg <sup>-1</sup>	3.23	(1)	13.06 $\pm$ 0.03*
Na (Na <sub>2</sub> O) échangeable		g kg <sup>-1</sup>	1.86	(1)	0.0352 $\pm$ 0.0003*
P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Olsen		g kg <sup>-1</sup>	0.04	(1)	2.0
Cd concentration		mg kg <sup>-1</sup>	0.90 $\pm$ 0.21	(15)	270
Zn concentration		mg kg <sup>-1</sup>	88 $\pm$ 20	(15)	21078
Cu concentration		mg kg <sup>-1</sup>	24.8 $\pm$ 4.3	(15)	406
Pb concentration		mg kg <sup>-1</sup>	109 $\pm$ 15	(15)	9135
Ni concentration		mg kg <sup>-1</sup>	18.5 $\pm$ 2.9	(15)	
As concentration		mg kg <sup>-1</sup>	17.7 $\pm$ 2.8	(15)	

\* Sarret G., communication personnelle

La valeur entre crochet regroupe la fraction inférieure à 50  $\mu\text{m}$

Les concentrations en Cd mesurées dans les parties aériennes de *A. halleri* se développant sur le site contaminé d'Auby sont supérieures au critère d'hyperaccumulation défini par Baker & Brooks (1989) et sont plus élevées que celles mesurées pour *A. halleri* se développant sur un site non contaminé (Tab. II-4). Utilisé dans la littérature (McGrath et al., 2006 ; Wieshammer et al., 2007), le facteur de bioconcentration (BCF), défini par Walton and Edwards (1986) comme étant le rapport de la concentration d'un polluant dans un organisme à sa concentration dans le biotope (e.g. dans notre cas :  $BCF = [Cd] \text{ partie aérienne des plantes} / [Cd] \text{ dans le sol}$ ), nous renseigne sur l'enrichissement (i.e.  $BCF > 1$ ) en Cd de *A. halleri* se développant sur sol contaminé et sol non contaminé. Le  $BCF_{Cd}$  mesuré pour *A. halleri* d'Auby est de 0.45 alors que celui mesuré pour *A. halleri* des Hautes Fagnes est de 20. La différence d'ordre de grandeur entre les  $BCF_{Cd}$  est aussi observée pour le  $BCF_{Zn}$  d'*A. halleri*. En effet, le  $BCF_{Zn}$  d'*A. halleri* d'Auby est de 0.57 alors que celui mesuré pour les plantes des Hautes Fagnes est de 33. Les BCF calculés illustrent le caractère (hyper)accumulateur de l'origine N-MET.

Tableau II-4: Concentration en métaux ( $mg\ kg^{-1}$  PS) dans les parties aériennes de *A. halleri* prélevées in situ sur un site contaminé et un site non contaminé (données issues de Bercquet, 2008)

	<i>A. halleri</i> d'origine MET			<i>A. halleri</i> d'origine N-MET		
	Site contaminé			Site non contaminé		
	Auby - Bois des Asturies (Fr)			Hautes Fagnes (Be)		
Cd	122	±	7	18	±	0.2
Zn	12015	±	316	2911	±	35
Cu	12.5	±	2.2	8	±	1
Pb	60	±	2	<QL		
As	<QL			<QL		

## II.1.5. Mise en culture et conception de l'expérience

### II.1.5.1. Mise en culture

Après vernalisation, c'est-à-dire après une semaine passée à 4°C et à l'abri de la lumière, les graines d'*A. halleri* ont été mises à germer sur du papier-filtre humidifié avec de l'eau déionisée. Les plantules ont été transférées sur du compost et cultivées pendant 4 semaines (Fig. II-8A). Juste avant le transfert sur le sédiment préparé (à  $t_{at}$ ) les concentrations en métaux dans les parties aériennes des plantules d'*A. halleri* des

deux origines ont été analysées. Après un lavage soigneux des racines à l'eau déionisée, les plantules d'*A. halleri* MET et N-MET ont été transférées dans des pots de 4L, contenant 2,8 kg de sédiment préparé (Fig. II-8B). Le suivi de la culture a commencé (sm pour "start monitoring") après une période de 3 semaines d'adaptation des plantes (PA pour "plant adaptation") au nouveau substrat. Dans la suite, les abréviations "sm" et "PA" désignent respectivement le début du suivi et la période d'adaptation des plantes au nouveau substrat.

Des pots de sédiment préparé non végétalisés ont été utilisés comme pots « témoins » afin d'apprécier l'impact de la plante sur le sédiment préparé. Des pots contenant un substrat non pollué, à savoir de la terre agricole (principales caractéristiques données en annexe II-1) ont été végétalisés par *A. halleri* des deux origines. Ces pots ont été utilisés afin d'apprécier l'impact du sédiment pollué sur les paramètres de croissance de la plante. Chaque pot végétalisé n'a contenu qu'une seule plante. L'expérience a été configurée pour une durée de 6 mois au cours desquels les plantes ont été cultivées en conditions contrôlées (12h de photo-période, température de jour/nuit 20/16°C, humidité relative à 80 %) et les pots ont été déplacés aléatoirement chaque semaine. L'humidité du sédiment a été maintenue à 80% de la capacité au champ par ajout régulier d'eau déionisée. Un total de 49 pots a été utilisé, dont 3 pour le sédiment témoin non végétalisé, 18 pour le sédiment végétalisé par chaque origine d'*A. halleri* (i.e. un triplicat pour chaque temps d'échantillonnage, de  $t_0$  (= "sm") à  $t_5$ ) et 5 pour la terre agricole végétalisée par chaque origine de *A. halleri* (analysés seulement à  $t_6$ ). Nous avons choisi de ne pas exploiter les données à  $t_6$  pour les pots végétalisés car à ce stade les plantes ont commencé à montrer des signes de toxicité. L'échantillonnage de plante a donc été arrêté à  $t_5$ .



Figure II-8 : Culture en conditions contrôlées : (A) Phase de germination d'*A. halleri* sur compost. (B) Pots contenant *A. halleri* sur sédiment



### **II.1.5.2. Suivi macroscopique : description des analyses réalisées**

Un suivi mensuel du sédiment, des plantes et des lixiviats a été réalisé pendant 5 mois. Chaque mois, trois pots par condition ont été retirés de l'expérience pour l'analyse des plantes et du sédiment.

#### **II.1.5.2.1. Suivi des plantes**

L'aspect des plantes et le diamètre de rosette ont été contrôlés mensuellement. De plus, sur les pots prélevés mensuellement, trois plantes de chaque origine ont été récoltées afin d'analyser leurs parties aériennes (la biomasse et les concentrations en métaux). Une fois récoltées, les parties aériennes des plantes ont été lavées à l'eau déionisée. Les parties aériennes ont ensuite été mises à sécher dans une étuve à 40°C jusqu'à poids constant, puis la biomasse a été pesée, broyée et homogénéisée pour préparer un aliquote par pot. Un g de matière sèche a été digéré dans 10 mL de HNO<sub>3</sub> et 3 mL de H<sub>2</sub>O, dans un four à micro-ondes. Les solutions ont été filtrées, ajustées à 100 mL avec de l'eau Milli-Q®, puis stockées à 4°C avant l'analyse. Les concentrations en métaux contenues dans les minéralisats ont été déterminées par ICP-AES. Des échantillons de feuilles d'épinard (SRM 1570a) ont été utilisés comme standard certifié.

#### **II.1.5.2.2. Suivi du sédiment**

Après séparation des racines, le sédiment est tamisé (< 2 mm), puis les analyses suivantes ont été réalisées selon les protocoles expérimentaux précédemment décrits (chapitre II, section II.1.2) : concentrations pseudo-totales en métaux, pH, carbone total (C<sub>TOT</sub>).

Le pool en métaux échangeables et le pool en métaux phytodisponibles ont aussi été mesurés sur les triplicats mensuellement. Pour déterminer le pool échangeable, nous avons choisi la méthode de l'extraction chimique au nitrate de calcium (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>). La composition du surnageant d'extraction au nitrate de calcium est en effet une bonne estimation de la composition du pool en métaux échangeables (McLaughlin et al., 2000 ; Conder et al., 2001 ; Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments, 2003).



Après broyage, puis tamisage ( $< 100 \mu\text{m}$ ) et séchage du sédiment à  $40^\circ\text{C}$ , 10 g (PS) de sédiment ont été agités dans 20 mL de  $(\text{Ca}(\text{NO}_3)_2)$  à 0.01 N (qualité analytique dans une eau ultra-pure) pendant 48 heures à température ambiante. Après centrifugation (20 minutes à 1200g - Beckman centrifuge), filtration ( $0.45 \mu\text{m}$ ) et acidification du surnageant (0.5 mL d'acide nitrique concentré, supra-pur), les concentrations en métaux ont été déterminées par ICP-AES.

En parallèle nous avons utilisé des DGT (Diffusive Gradient in Thin films) pour quantifier le pool de métaux phytodisponibles. Cette technique se base sur un dispositif associant des résines chélatantes incluses dans un gel (chelex, couche de 0.4mm) associé à un gel polyacrylamide de diffusion de porosité connue (couche de 0.7 mm) et un filtre membranaire (nitrate de cellulose, couche de 0.13 mm). Ces dispositifs ont été fournis par DGT Research Ltd ([www.dgtresearch.com](http://www.dgtresearch.com)). 100 g de sédiment tamisé ( $< 100 \mu\text{m}$ ) ont été humidifiés à 100% de la capacité au champ, puis manuellement mélangés afin d'obtenir un mélange lisse. Cette pâte a été mise sous agitation pendant 3 jours. Les DGT ont été déposées à la surface de cette pâte, puis légèrement pressées, afin qu'il y ait un bon contact entre le dispositif et le sédiment (Fig. II-9). Le tout a ensuite été placé pour 17h dans une étuve thermostatée entre  $20^\circ\text{C}$  et  $24^\circ\text{C}$  et comme pourrait le faire une racine, la DGT prélève les métaux présents en solution, induisant ainsi une déplétion et une réalimentation par la phase solide. Les DGT ont ensuite été rincées à l'eau Milli Q® puis expédiées à DGT Research Ltd pour les analyses en métaux et la détermination de  $C_{\text{DGT}}$ .

Pour un temps de déploiement défini, la concentration en métal fixé sur la résine peut alors être reliée à la concentration effective de métal labile  $C_{\text{DGT}}$  (Zhang et al., 2001) selon l'équation suivante :

$$C_{\text{DGT}} = M \Delta g / D A t,$$

où M est la masse de métal accumulé ;  $\Delta g$ , l'épaisseur de la couche de gel diffusif ; D, le coefficient de diffusion ; A, l'aire du gel et t, le temps de déploiement du DGT (cf Zhang et al., 2001 ; section I.3.4.1).

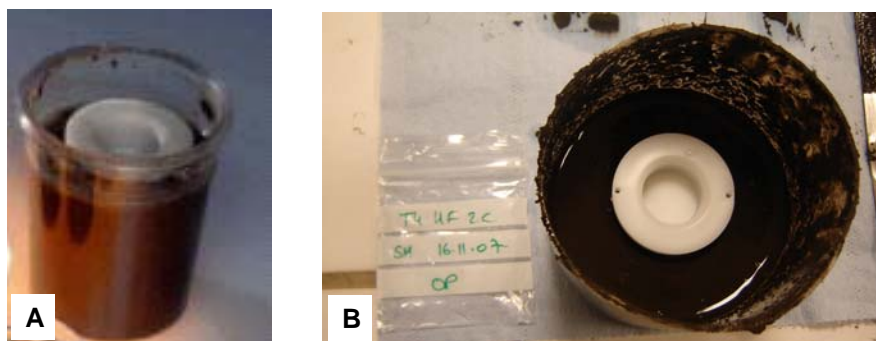


Figure II-9 : Dispositif expérimental de déploiement des DGT dans le sédiment : vue de profil (A), vue du dessus (B).

#### II.1.5.2.3. Suivi des lixiviats

Le suivi des lixiviats a été réalisé chaque mois sur les trois mêmes pots (cultivés ou non). Ces trois pots étaient surélevés et les lixiviats ont été récupérés dans la coupelle du pot, après un apport d'1 L d'eau déionisée, livrée par petits volumes (200 mL). Les lixiviats sont collectés pendant 2 heures suite à l'arrosage. Le volume des lixiviats obtenus a été mesuré, ainsi que les concentrations en métaux et en sulfate. Les lixiviats ont été filtrés (0.45  $\mu\text{m}$ ), et des aliquotes de 10 mL ont été acidifiées avec  $\text{HNO}_3$  (suprapur®) puis stockés à 4°C avant analyse. Les concentrations en métaux ont été déterminées par ICP-AES pour lequel le contrôle de la qualité des mesures est basé sur l'utilisation d'échantillons de contrôle internes. Les concentrations en sulfate ont été déterminées par chromatographie ionique (Dionex DX 500 - des dilutions par 100 ou 50 sont nécessaires).

#### II.1.5.2.4. Analyses statistiques

Afin d'évaluer l'effet du temps, de la présence ou l'absence de la plante et de l'origine de la plante sur les différents paramètres analysés, des analyses statistiques ont été réalisées, à savoir :

- des ANOVA (Analyse of Variance) à un et deux facteurs visant à comparer des moyennes sur plusieurs échantillons, suivies par un test post hoc de Tukey mettant en évidence les différences dans les comparaisons et spécifiant le ou les groupes responsables d'une ou plusieurs différences (Programme statistique utilisé : SPSS 15.0 (2007)).

- Des tests de Student visant à tester si deux valeurs ne sont pas différentes (Test de moyenne équivalente - SPSS 15.0 (2007)).

## **II.1.6. Etude de la spéciation avant et après culture du Cd présent dans le pot**

### **II.1.6.1. Préparations des échantillons**

La localisation spéciation du Cd contenu dans le sédiment avant et après culture ont été déterminées par microscopie électronique et par fluorescence X et absorption X sur rayonnement synchrotron. Ces techniques nécessitent une préparation spécifique des échantillons.

#### **II.1.6.1.1. Préparation pour analyses globales**

Des aliquotes de sédiment initial, *i.e* de sédiment en conditions anoxiques prélevé juste après le curage (Fig. II-11), ont été prélevées, séchées par lyophilisation (Heto Power dry pl3000 – Thermo Electron corporation), puis broyées manuellement dans un mortier en agate, homogénéisées manuellement et préparées sous forme de pastilles, à l'aide d'une presse, pour les analyses EXAFS. Des aliquotes du sédiment préparé (Fig. II-11), *i.e.* du sédiment séché à l'air pendant 7 mois et préparé ayant servi au remplissage des pots de culture, ont été prélevées avant le transfert des plantes ( $t_{at}$ ) et préparées de la même façon pour les analyses EXAFS et XANES. A ce jour, les pastilles de sédiment préparé ont seulement été analysées en XANES. Des aliquotes des différentes fractions granulométriques contenant du Cd ont été préparées de la même façon et analysées en EXAFS (Fig.II-11).

En fin de culture, *i.e.* à  $t_5$ , le sédiment des pots végétalisés par *A. halleri* de chaque origine, a été échantillonné (Fig.II-11). Après récolte des parties aériennes, les 2.8 kg de sédiment contenu dans le pot ont été démontés et un quart a été conservé intact pour la préparation d'échantillons pour les micro-analyses (description chapitre II.1.6.1.2). Une fois le collet de la plante retiré, le reste du sédiment a été émotté puis tamisé à 2mm pour enlever un maximum de racines. Le sédiment a ensuite été homogénéisé manuellement afin d'obtenir des échantillons de sédiment aussi représentatifs que possible de l'ensemble du sédiment présent dans le pot. Ainsi des aliquotes ont été prélevées, séchées par lyophilisation, broyées et préparées sous forme de pastilles comme décrit précédemment pour le sédiment avant culture. Des aliquotes de sédiment

contenu dans les pots témoins non végétalisés ont été prélevées à *t6* et préparées sous forme de pastilles en suivant le même protocole que le sédiment provenant des pots végétalisés (Fig. II-11).

Toutes les étapes d'homogénéisation sont importantes afin d'obtenir des échantillons représentatifs, car ces échantillons analysés en EXAFS fournissent une information moyenne: le signal global de l'environnement moléculaire du Cd dans le sédiment.

#### II.1.6.1.2. Préparation pour micro-analyses

Une fois lyophilisé, le sédiment préparé a été conditionné sous forme de lames imprégnées de résine qui sont polies jusqu'à l'obtention d'une lame mince d'environ 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Fig.II-10).

Pour le sédiment des pots végétalisés, un quart du pot a été conservé pour la préparation d'échantillons pour les micro analyses. Les lames minces ont été réalisées à partir d'un bloc de sédiment prélevé hors de la zone du collet, à une distance d'au moins 5 cm de la surface, des bords et du fond du pot (Fig. II-10). Après un séchage par lyophilisation, chaque bloc prélevé a été imprégné de résine epoxy puis poli jusqu'à l'obtention d'une lame mince. Ce protocole permet une relativement bonne préservation de la structure de l'échantillon.

Les lames minces de sédiment ont été préparées à l'ENSM de Douai pour les observations en microscopie optique et pour les analyses MEB-EDS,  $\mu\text{XRF}$  et  $\mu\text{XANES}$ .

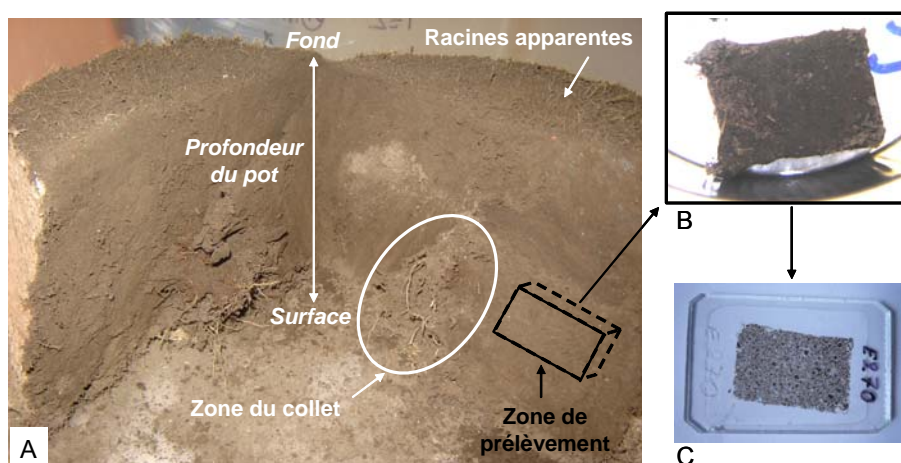


Figure II-10 : (A) Pot de sédiment végétalisé après démontage et coupe en deux parties. Sur cette coupe, la zone de prélèvement, la zone du collet de la plante sont repérées. Bien que les racines soient très fines, certaines sont visibles sur le fond du pot. (B) Bloc de sédiment prélevé avant lyophilisation. (C) Lame mince obtenue à partir du bloc de sédiment prélevé.

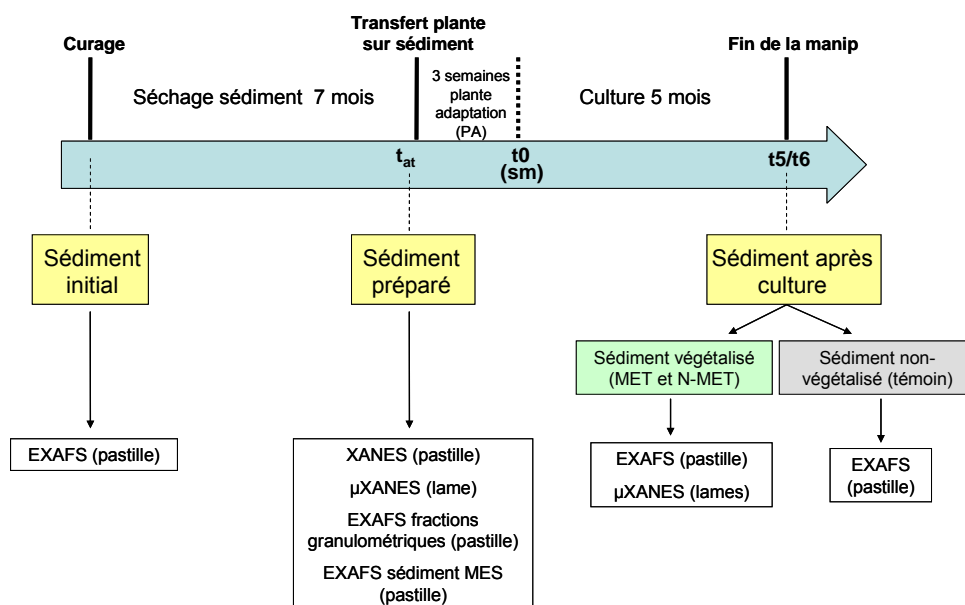


Figure II-11 : Schéma récapitulatif des analyses réalisées par spectroscopie à rayons X sur les différents échantillons de sédiment étudiés.

#### II.1.6.2. Identification des phases porteuses individuelles

Les micro-analyses ont été réalisées sur les lames minces par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie en dispersion d'énergie (MEB-EDS). Les lames du sédiment préparé et des différentes fractions granulométriques ont été analysées sur un MEB Environnemental (Quanta 200, FEI) équipé du système EDS (Quanta Tax de chez Bruker contenant un détecteur RONTEC Single Drift Detector), à l'Université de Lille, au laboratoire PBDS (Processus et Bilans des Domaines Sédimentaires). La surface des lames a été rendue conductrice par dépôt d'une couche d'environ 15 nm d'épaisseur de carbone. La tension d'accélération des électrons était de 20kV et les observations et analyses ont été réalisées à 0.5 Torr. Les observations et analyses des lames de sédiment après culture ont été menées sur un MEB à effet de champ et émission Schottky (FEG CD-SEM Hitachi S4300 SE/N) du département Génie Civil et Environnemental de l'ENSM de Douai. Le détecteur d'électrons rétrodiffusés était de type YAG Simple Cristal et la détection des rayons X a été faite par un détecteur Thermo Scientific Ultradry Silicon Drift. La tension d'accélération était de 20 kV, les analyses ont été réalisées sous un vide partiel de 30 Pa (3990 Torr).

Dans cette étude, la stratégie d'observation des échantillons a consisté à rechercher les phases métallifères. Les éléments lourds ayant un pouvoir de rétrodiffusion des électrons plus important, les zones riches en métaux apparaissent en surbrillance sur les images obtenues en mode électrons rétrodiffusés. Des spectres EDS ponctuels ont ensuite été enregistrés dans les zones d'intérêt afin d'estimer la composition chimique. Des cartographies élémentaires ont également été enregistrées. Pour cela, une acquisition point par point est réalisée et pour chaque élément, l'intensité du signal mesuré dans une région d'intérêt définie et dans un temps donné est reportée sous forme de niveaux de couleur. Le traitement des observations et des analyses a été réalisé à l'aide du logiciel Noran System Six version 2.0. Sur les lames de sédiment préparé, nous avons repéré 10 zones d'intérêt sur 2 lames différentes. Sur les lames de sédiment après culture, nous avons repérés 12 zones d'intérêt : 6 sur une lame de sédiment végétalisé par *A. halleri* d'origine MET et 6 pour une lame de sédiment végétalisé par *A. halleri* d'origine N-MET.

Des cartographies élémentaires et des analyses ponctuelles ont également été obtenues par microfluorescence X ( $\mu$ XRF) sur la ligne LUCIA (voir description de la ligne au paragraphe II. 1.6.3.2). Deux énergies incidentes ont été choisies, 3550 et 4100 eV. La première permet d'exciter la raie  $L_{III}$  de Cd (3538 eV) et les raies K des éléments légers de Z inférieur à celui du potassium (Si, P, S et Cl). En revanche, la raie K de K (3608 eV) est volontairement exclue car dans certains composés (notamment les organiques) le signal de Cd pourrait être masqué par celui du potassium. La seconde énergie incidente permet d'exciter également K et Ca. La gamme d'énergie de la ligne LUCIA permet d'atteindre le seuil K de Fe (7112 eV), mais ce changement d'énergie et les réglages nécessaires auraient entraîné une perte de temps importante. Les cartes élémentaires sont obtenues via un programme écrit par P. Lagarde (ligne LUCIA) qui normalise les intensités de fluorescence par  $I_0$  et le temps de comptage. Ce même logiciel permet de générer des diagrammes de corrélation des différents éléments en présence (e.g. Cd/S, Cd/P,...). Pour chaque spot repéré, les rapports d'intensités de fluorescence sont calculés à partir des intensités de fluorescence mesurées en chaque spot. Toutes les zones d'intérêt observées au MEB (23 zones au total) ont été cartographiées en  $\mu$ XRF, mais nous ne présenterons que quelques zones représentatives dans ce manuscrit.

### II.1.6.3. Détermination de la spéciation et quantification des espèces chimiques par spectroscopie d'absorption des rayons X

Les mesures effectuées dans le cadre de ce travail ont été réalisées sur deux synchrotrons :

- l'ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) à Grenoble (France), sur la ligne de lumière FAME (pour « *French Absorption spectroscopy beamline in Materiel and Environmental science* »), pour les analyses EXAFS au seuil K de Cd sur des échantillons globaux (pastilles de sédiment).
- la SLS (Swiss Light Source) à Villigen (Suisse) sur la ligne de lumière LUCIA (pour « *Line for Ultimate Characterizations by Imaging and Absorption* »), pour les analyses micro-XANES aux seuils  $L_{III}$  de Cd et K de S sur les lames minces de sédiment.

Le principe de la spectroscopie sur rayonnement synchrotron a été décrit précédemment dans le chapitre 1. Dans les paragraphes suivants, pour chaque ligne de lumière utilisée, nous détaillerons, après une présentation succincte de la ligne, les données acquises, leur traitement et les modes d'exploitation utilisés.

#### II.1.6.3.1. Analyses EXAFS globales sur FAME

##### Description de la ligne

La ligne FAME est dédiée à la spectroscopie d'absorption de rayons X dans des systèmes environnementaux et biologiques dilués. Pour ce type d'études, les exigences techniques sont un flux de photons important sur l'échantillon, un système de détection de fluorescence très sensible et une très bonne stabilité du faisceau afin d'optimiser le rapport signal/bruit. Pour la fluorescence, un détecteur Canberra 30 éléments au germanium est utilisé. La ligne est équipée d'un monochromateur composé de deux cristaux en silicium permettant de sélectionner la gamme d'énergie disponible entre 4 à 40 KeV comme, par exemple, le seuil K du Cd (26.711 KeV), et d'une focalisation sagittale par courbure du 2<sup>ème</sup> cristal permettant d'obtenir un faisceau de 300  $\mu\text{m}$  (largeur) par 150  $\mu\text{m}$  (hauteur). Elle est équipée d'un cryostat à hélium qui permet l'étude d'échantillons hydratés congelés (ex : tissus végétaux) et la réduction des dommages d'irradiation. Le schéma de principe de l'instrument FAME est représenté dans la figure II-12.

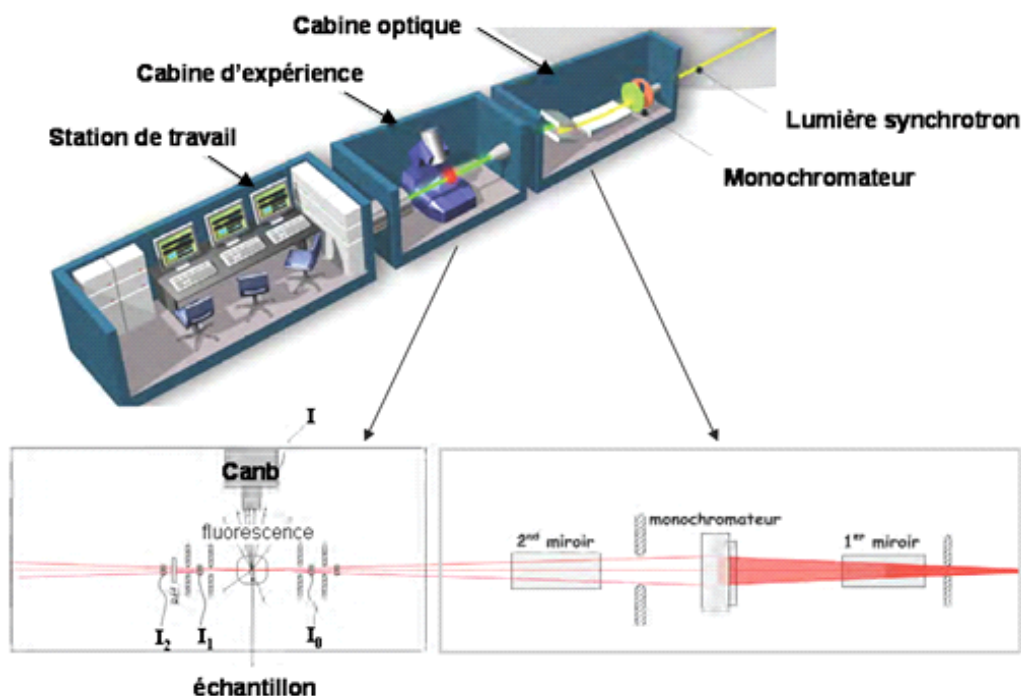


Figure II-12 : Schéma simplifié de la ligne de lumière FAME dédiée à la XAS (ESRF – [www.esrf.fr](http://www.esrf.fr) et [www.synchrotron-soleil.fr](http://www.synchrotron-soleil.fr)).

### Acquisition des données

Sur cette ligne, les spectres EXAFS au seuil K du Cd ont été enregistrés en mode fluorescence pour les échantillons dilués et en mode transmission pour les échantillons concentrés (références solides). Pour la fluorescence, des scans de 45 min ont été sommés en vue d'obtenir au moins  $10^5$  coups de fluorescence de Cd par seconde après le seuil d'absorption. Chaque spectre présenté est une somme d'environ 10 scans.

### Traitement des données

Les spectres ont été normalisés à la hauteur du saut d'absorption en utilisant une fonction linéaire pour l'avant seuil ( $\mu_0$ ) et en divisant le spectre obtenu par la hauteur du seuil ( $\Delta\mu$  - fig. II-13). On soustrait alors au spectre une fonction spline composée de polynômes du troisième degré joints entre eux reproduisant l'absorption de l'atome excité sans voisin  $\mu_1$ . On obtient alors la fonction  $\mu(E)$  selon l'équation:

$$\mu(E) = (\mu_{\text{exp}}(E) - \mu_1(E)) / (\mu_1(E) - \mu_0(E))$$



On procède alors à un changement d'abscisse, transposant les énergies mesurées en vecteur d'onde grâce à la formule :

$$k (\text{\AA}^{-1}) = \sqrt{\frac{8\pi^2 m_e (E - E_0)}{h^2}} = 0,5123 \sqrt{E (eV) - E_0 (eV)}$$

où  $m_e$  est la masse de l'électron,  $E_0$  et  $E$  sont les énergies mesurées et  $h$  est la constante de Planck.

On obtient alors la fonction  $\chi(k)$ . Du fait que l'oscillation EXAFS décroît fortement avec l'énergie, il est souvent utile de multiplier la fonction  $\chi$  par une puissance de  $k$  ( $k$ ,  $k^2$  ou  $k^3$ ) de façon à renforcer le signal à haut  $k$ , avec toutefois l'inconvénient d'augmenter également la contribution du bruit dans cette région.

Une transformée de Fourier (TF) permet ensuite de visualiser la variation de la densité atomique autour de l'atome cible à un déphasage près, dépendant, entre autres, de la nature des atomes. La TF est calculée en utilisant une fenêtre d'apodisation de type Kaiser-Bessel. Notons que les abscisses des TF ne correspondent pas aux distances réelles mais sont décalées d'un facteur  $\Delta R$  qui dépend de la nature des atomes. Il faut donc effectuer la simulation pour déterminer la distance réelle de chaque contribution.

### Exploitation des données

L'identification et la quantification des formes chimiques de Cd à partir des spectres EXAFS ont été faites par deux méthodes : par combinaisons linéaires et par simulation des couches de coordination.

#### *Reconstruction du signal EXAFS par combinaisons linéaires (CL)*

Cette méthode repose sur le fait que le signal EXAFS (représenté dans l'espace des vecteurs d'onde  $k$ ) est une somme pondérée des contributions de chaque forme chimique du Cd présente dans l'échantillon. Cette méthode simple est largement utilisée pour l'étude des systèmes naturels (Ostergren *et al.*, 1999, Manceau *et al.*, 2000, Ressler *et al.*, 2000, Cances *et al.*, 2005, Panfili *et al.*, 2005, Kirpichtchikova *et al.*, 2006, Schlegel *et al.*, 2006). Lorsqu'on dispose d'un nombre de spectres expérimentaux

suffisant ( $> 10$  environ) et pour lesquels la distribution des espèces varie d'un échantillon à l'autre, l'Analyse en Composantes Principales (ACP) de cet ensemble de spectres permet de déterminer le nombre de composantes, c'est-à-dire le nombre d'espèces de l'élément considéré, et de les identifier par reconstruction à l'aide des spectres de référence (Wasserman, 1997 ; Ressler et al., 2000; Manceau et al., 2002).

L'approche par CL ou ACP et CL nécessite une base de données exhaustive en spectres de composés modèles. Il existe relativement peu de données publiées sur le seuil K de Cd. Les spectres de référence utilisés dans cette étude ont été enregistrés, et certains ont été fournis par des collègues (M.P. Isaure et L. Spadini) (liste des composés en annexe II-2).

De plus, cette approche suppose que chaque espèce est indépendante, c'est-à-dire qu'elle a une signature spectrale unique. Or, certains composés ont des spectres semblables (cf chapitre II, section II.3.1). Il est donc nécessaire de regrouper ces composés en familles (par exemple Cd-COOH/OH).

Dans certains cas, le nombre de spectres EXAFS expérimentaux est insuffisant pour une ACP, on utilise donc les CL uniquement (Sarret et al., 2006). L'identification des composantes est faite en comparant pour chaque échantillon les combinaisons linéaires obtenues à  $n$  et  $n+1$  composantes à l'aide du programme fit0600 (Girard & Eybert, 2000). Si le résidu, noté EFF (somme des carrés des écarts entre spectre expérimental et spectre reconstruit) diminue de plus de 10% entre la reconstruction à  $n$  et  $n+1$  composantes, alors on retient celle à  $n+1$  composantes. Dans la plupart des cas, plusieurs combinaisons de qualité équivalente sont obtenues pour un même échantillon. Les simulations considérées comme acceptables sont définies par un EFF compris entre celui obtenu pour la meilleure simulation ( $EFF_{best}$ ) et  $1.1 \text{ } EFF_{best}$ . Nous avons donc calculé la moyenne et l'écart-type des pourcentages des espèces sur l'ensemble de ces simulations retenues. Les écart-types parfois petits ne correspondent pas à l'incertitude car ils dépendent fortement de la bibliothèque de spectres de référence utilisée. La sensibilité de cette approche est généralement estimée à  $\pm 10\%$ , c'est-à-dire qu'une phase représentant moins de 10% de Cd total n'est pas détectée. Par conséquent les contributions d'espèces minoritaires  $< 10\%$  sont à considérer avec précaution.

### *Simulation des couches de coordination*

Cette méthode consiste à simuler numériquement les différentes sphères de coordination, obtenues à partir des pics de la transformée de Fourier (TF) du spectre. La méthode est difficilement applicable lorsqu'un échantillon contient un mélange de plusieurs espèces car chaque pic de la TF résulte de la contribution de tous les atomes rétrodiffuseurs de l'élément cible, augmentant ainsi le nombre des paramètres à ajuster pour la simulation, et certaines contributions peuvent s'annuler du fait d'interférences destructives.

Le spectre EXAFS filtré est modélisé pour extraire les paramètres structuraux de chaque couche  $j$  :  $N_j$  (nombre de voisins de nature  $j$ ),  $R_j$  (distance entre l'atome cible et les atomes  $j$  diffuseurs de même nature),  $\sigma_j$  (facteur de Debye-Waller ou terme de désordre qui est corrélé au désordre thermique et structural des distances) et  $\Delta E$  (écart entre la valeur théorique du seuil d'absorption de l'élément et la valeur issue de l'affinement). Cette simulation a été réalisée en utilisant le logiciel ARTEMIS (Ravel et Newville, 2005) qui comprend les programmes FEFF 6.0 et ATOMS. FEFF calcule les fonctions d'amplitude et de déphasage pour chaque trajet entre l'atome central et l'atome voisin considéré, à partir de la structure d'un composé proche de l'échantillon. Le programme ATOMS est utilisé pour créer un fichier d'entrée à FEFF à partir des fichiers cristallographiques (type CIF). Dans cette étude, les structures des composés suivants ont été utilisées :

- pour les paires Cd-S, Cd-Cd et Cd-Zn : greenockite (CdS), sphalérite enrichie en Cd ((Zn, Cd)S), et cernyite ( $\text{Cu}_2(\text{Cd}_{0.37}\text{Zn}_{0.33}\text{Fe}_{0.29})\text{SnS}_4$ ) (Szymanski, 1978),
- pour les paires Cd-O, Cd-P et Cd-C : otavite ( $\text{CdCO}_3$  - isomorphe de la calcite) (Borodin et al., 1979),  $\text{Cd}_5\text{H}_2(\text{PO}_4)_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_4$  (Hideki et al., 1976), et  $(\text{C}_4\text{H}_8\text{Cd}_2\text{O}_{12})_n \cdot 2n(\text{H}_2\text{O})$  (Orioli et al., 2002).

Les incertitudes, estimées à partir des simulations des composés modèles, sont au maximum de  $\pm 0.05 \text{ \AA}$  pour les distances et de  $\pm 30 \%$  sur les nombres de coordination. Les paramètres calculés sont de plus corrélés entre eux :  $N$  et  $\sigma$  d'une part et  $R$  et  $\Delta E$  d'autre part. La qualité de la simulation est estimée via le R factor (résidu ou somme des carrés des écarts normalisée).

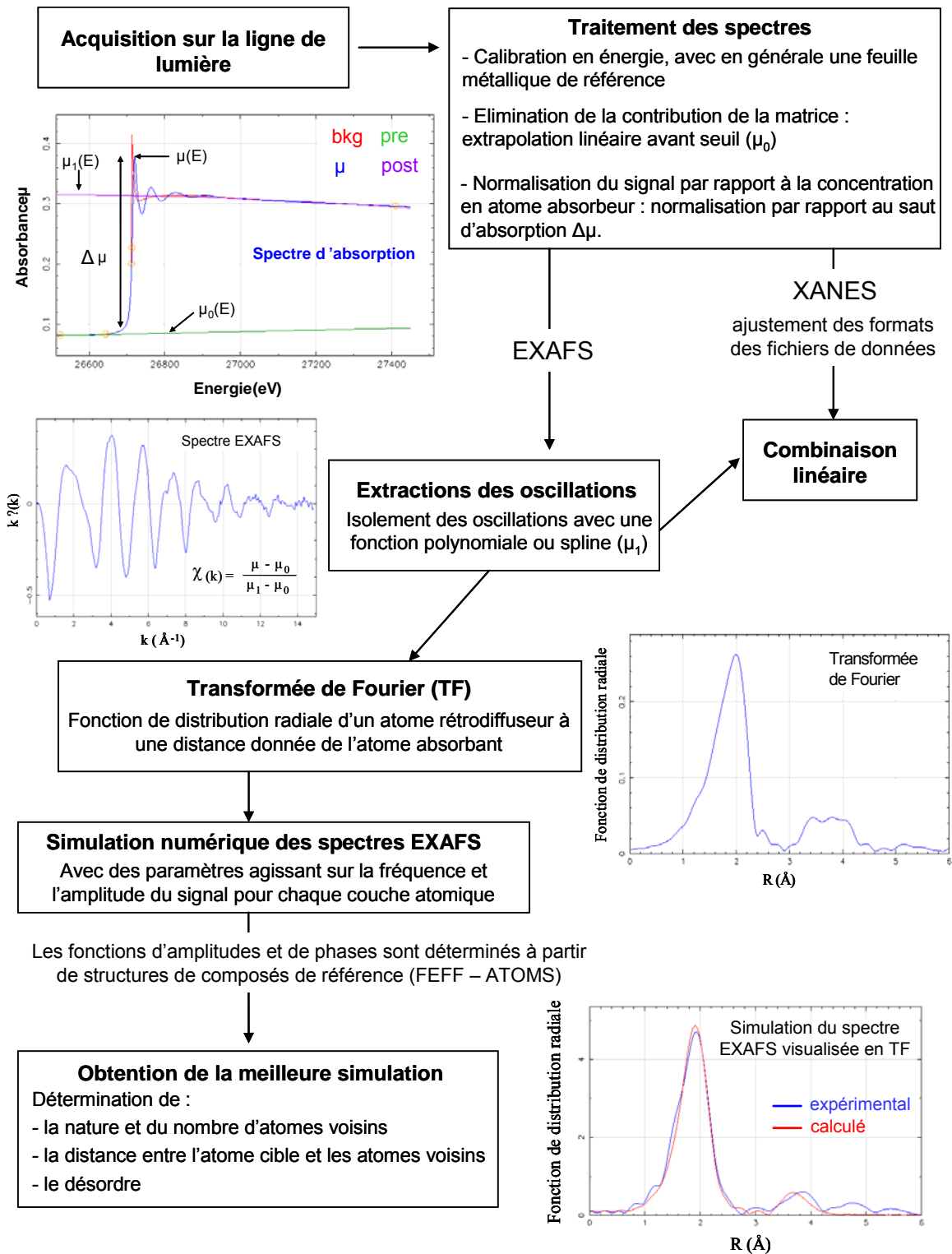


Figure II-13 : Organigramme de traitement des données EXAFS

### II.1.6.3.2. Analyses $\mu$ XRF et $\mu$ XANES sur LUCIA

#### Composition de la ligne

LUCIA est une ligne de spectro-microscopie dédiée à la spectroscopie d'absorption X dans la gamme d'énergie allant de 0.8 à 8 KeV, avec une taille de faisceau de l'ordre du micromètre. Elle permet l'acquisition de cartes de microfluorescence X pour localiser les éléments, et de spectres XANES ou EXAFS dans les zones d'intérêt des cartographies élémentaires.

La configuration générale de la ligne de lumière est montrée sur la figure II-14. Après la tête de la ligne équipée d'un système de fente de précision, le faisceau de photons est réfléchi sur un miroir sphérique fixe. La convergence finale est réalisée à l'aide d'un système de miroirs en configuration Kirkpatrick-Baez (KB). Un ensemble de deux miroirs plans parallèles constitue un filtre « passe bas » qui supprime les harmoniques d'ordre supérieur. Le monochromateur est un double cristal et le détecteur de fluorescence est un Silicon drift detector.

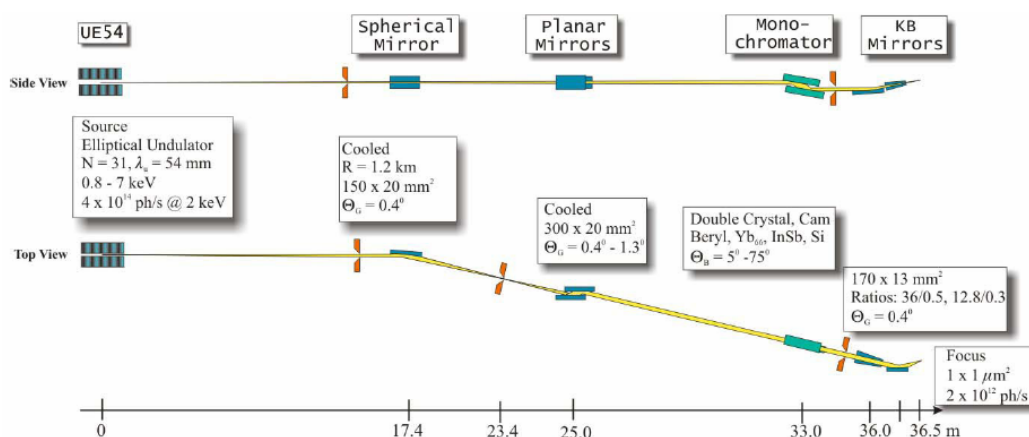


Figure II-14 : Schéma de la ligne de lumière LUCIA (SLS ; <http://www.synchrotron-soleil.fr>).

#### Acquisition des données

Dans notre étude, nous avons travaillé en mode fluorescence, sous un faisceau X focalisé à  $2.5 \times 5$   $\mu$ m. Dans un premier temps, une fois la lame mince installée pour l'analyse, un repérage au moyen de la caméra montée sur la ligne a été effectué afin de repérer morphologiquement les grains riches en Cd et/ou en S repérés au préalable au

MEB-EDS. Une fois localisé, des cartographies des distributions élémentaires du grain et de la région associée ont été enregistrées par microfluorescence à rayon X ( $\mu$ XRF) (taille des pixels de 2 à 5  $\mu$ m) et un temps de comptage d'environ 1 à 2 s par point.

#### *$\mu$ XANES au seuil $L_{III}$ du Cd*

Ensuite, des spectres  $\mu$ XANES ont été enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd sur des spots des zones d'intérêt choisies des lames minces et sur des pastilles de sédiment préparé et de composés de référence après défocalisation du faisceau (50  $\mu$ m \* 50  $\mu$ m). Ces spectres ont été enregistrés à température ambiante. Le temps d'enregistrement d'un spectre XANES est d'environ 20 minutes. Le nombre de spectres à sommer varie en fonction de la matrice : 2 spectres pour les composés de référence et en généralement 6 spectres pour les échantillons. Les spectres sont tout d'abord recalés en énergie par rapport au spectre de la pyrite (maximum de la raie blanche de la pyrite à 2471.3 eV), puis normalisés et interpolés de la même façon que pour les spectres EXAFS. Toutes ces étapes ont été réalisées via le logiciel WINXAS version 13.11. L'exploitation des résultats a été effectuée par combinaisons linéaires via le programme fit0600 (Girard et Eybert, 2000). Pour cela, les abscisses ont été interpolées pour que le pas en énergie soit identique pour tous les spectres.

#### *$\mu$ XANES au seuil K du S*

Le signal XANES du S a permis de déterminer la spéciation du soufre par combinaisons linéaires comme décrit précédemment (Sarret et al., 1999 ; Foriel, et al., 2004). Des spectres  $\mu$ XANES ont été enregistrés au seuil K du S sur les spots analysés au seuil  $L_{III}$  du Cd (faisceau focalisé) ainsi que sur des pastilles de sédiment préparé et de composés de référence (faisceau non focalisé). L'originalité de notre travail repose sur le fait que nous pouvons caractériser la spéciation du Cd et du S à la fois sur un même spot, ce qui permet de recouper les informations si la zone contient CdS par exemple, et d'avoir une information sur l'état d'oxydation du sédiment, le soufre étant un bon marqueur redox. Les spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil K de S ont été traités de la même façon que ceux au seuil  $L_{III}$  du Cd (calibration en énergie, normalisation, interpolation, simulation par combinaisons linéaires). Pour les CL, nous avons utilisé des composés de référence où le S présente des degrés d'oxydation différents, allant de +VI pour les sulfates au -II pour les sulfures (cf chapitre II, section II.3.1).

## **II.2. Suivi macroscopique de la plante et du sédiment lors de la culture : Résultats**

### **II.2.1. Paramètres de croissance des plantes**

Au début de l'expérience, les plantules des deux origines ont été transférées sur le sédiment. A l'instant  $t_{at}$ , c'est-à-dire juste avant le transfert, les plantules MET et N-MET présentaient des biomasses similaires (test de Student,  $P < 0.05$ ,  $3.0 \pm 1.1$  g et  $3.2 \pm 1.7$  g respectivement, fig. II-15).

Pour les deux origines, les biomasses mesurées au premier mois du suivi sont supérieures à celles mesurées à  $t_{at}$ . Ceci suggère que les plantes des deux origines sont capables de se développer sur le sédiment contaminé. Au cours du suivi, les plantes d'origine MET développent plus de biomasse que les plantes d'origine N-MET. Elles présentent également des diamètres supérieurs (annexe II-3).

A partir de  $t1$ , la biomasse des plantes N-MET n'augmente plus ( $P > 0.05$  – fig. II-15 ; la non significativité du test dans ce cas peut être due aux forts écart-types). La biomasse des plantes MET augmente entre  $t1$  et  $t3$ , puis diminue entre  $t3$  et  $t5$  ( $P < 0.05$  - fig. II-15). Lors du 4<sup>ème</sup> mois, une partie des feuilles a commencé à montrer des signes de sécheresse (Annexe II-4). La diminution de biomasse pour les plantes MET entre  $t3$  et  $t5$  pourrait être due à la toxicité du sédiment et/ou à la présence de pucerons apparus sur les plantes lors du 3<sup>ème</sup> mois de culture. Ce moment coïncide avec l'apparition de hampes florales (Annexe II-4) ; les plantes N-MET ont fleuri à  $t4$ .

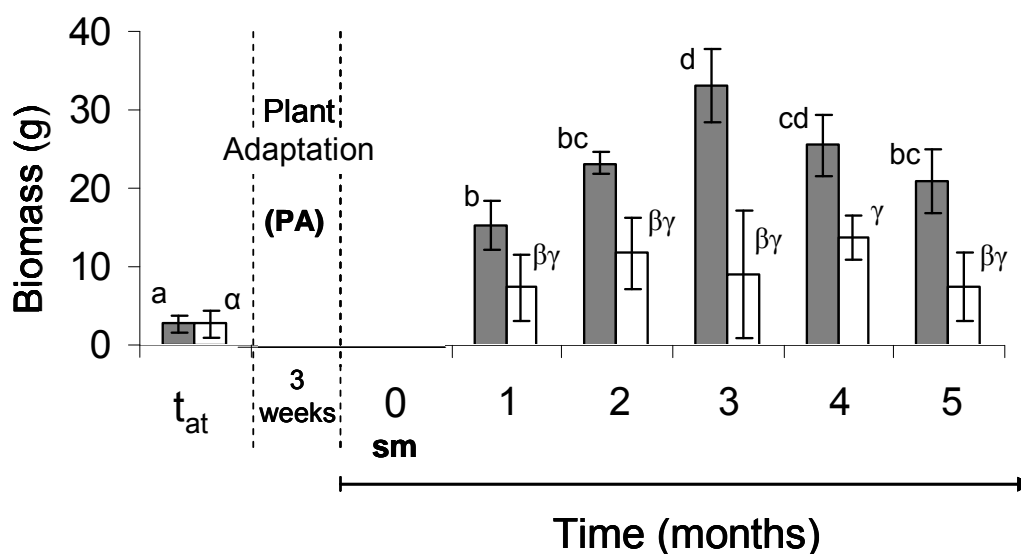


Figure II-15 : Biomasse des parties aériennes de *A. halleri* d'origine MET (gris foncé) et N-MET (blanc) juste avant le transfert des plantes sur sédiment ( $t_{at}$ ) et pour chaque mois du suivi (moyenne et écart-type réalisés sur 3 échantillons). "sm" signifie "start monitoring" et indique le début du suivi. Pour chaque origine de plante, les résultats des tests statistiques sont indiqués par des lettres de l'alphabet Latin pour les plantes MET et l'alphabet Grec pour les plantes N-MET. Une lettre différente indique une différence significative pour un niveau  $P = 0.05$ .

### II.2.2. Accumulation du Cd et du Zn dans les parties aériennes des plantes

Les concentrations en métaux mesurées dans les plantes à  $t_{at}$ , c'est-à-dire juste avant transfert sur le sédiment sont les suivantes:  $3.7 \pm 2.4$  mg Cd kg<sup>-1</sup>,  $877 \pm 341$  mg Zn kg<sup>-1</sup> et  $3.7 \pm 0.4$  mg Cu kg<sup>-1</sup> pour les plantes MET et  $4.7 \pm 1.0$  mg Cd kg<sup>-1</sup>,  $880 \pm 67$  mg Zn kg<sup>-1</sup> et  $4.6 \pm 0.3$  mg Cu kg<sup>-1</sup> pour les plantes N-MET (Fig. II-16). Il n'y a pas de différence significative entre les origines (test de Student,  $P < 0.05$ ).

A partir du premier mois de suivi et pour tous les autres mois de suivi, les concentrations en Cd, Zn et Cu sont supérieures à celles mesurées dans les plantules avant transfert sur sédiment. Par exemple, entre  $t_{at}$  et  $t_1$ , dans les parties aériennes des plantes MET et N-MET, les concentrations en Cd ont respectivement augmenté d'un facteur 30 et 39, les concentrations en Zn d'un facteur 8.5 et 10 et pour le Cu d'un facteur 2.4 et 1.8.



Les résultats d'une ANOVA à deux facteurs réalisée sur l'ensemble des données des concentrations en Cd mesurées dans les parties aériennes des plantes MET et N-MET pour tous les temps du suivi montrent qu'il n'y a ni *effet origine* de la plante, ni *effet temps* (Fig. II-16,  $P > 0.05$ ). Les écart-types sont importants, ce qui suggère une grande variabilité interindividuelle des plantes vis-à-vis de l'accumulation du Cd (Fig. II-16).

Au cours du suivi, toutes les concentrations en Cd mesurées atteignent la valeur du seuil d'hyperaccumulation, défini à  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  poids sec (PS) (Baker and Brooks, 1989, Wenzel and Jockwer, 1999, Bert et al., 2002), excepté à  $t_2$  pour les plantes N-MET. Les plus fortes concentrations en Cd sont de  $204 \pm 96 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $n=3 \pm \text{SD}$ ) et de  $185 \pm 18 \text{ mg.kg}^{-1}$  pour, respectivement, les plantes MET à  $t_5$  et N-MET à  $t_1$  (Fig. II-16). A  $t_5$ , les concentrations en Cd pour les plantes N-MET sont de  $169 \pm 101 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $n=3 \pm \text{SD}$ , fig. II-16).

Pour les résultats d'accumulation du Zn dans les parties aériennes de *A. halleri* MET et N-MET, les résultats de l'ANOVA à deux facteurs montrent qu'il y a un *effet origine* ( $P < 0.01$ ) et qu'il y a un effet temps ( $P < 0.05$ ). L'accumulation du Zn dans les plantes MET et N-MET augmente significativement entre le premier et le dernier mois de culture ( $P < 0.05$ , fig. II-16).

A  $t_2$ ,  $t_3$ ,  $t_4$  et  $t_5$  les plantes N-MET accumulent plus de Zn dans leurs parties aériennes que les plantes MET (Fig. II-16). De plus, pour les temps pré-cités, les concentrations en Zn des plantes N-MET sont supérieures à la valeur seuil d'hyperaccumulation du Zn, définie à  $10\,000 \text{ mg kg}^{-1}$  PS (Baker and Brooks, 1989, Wenzel and Jockwer, 1999, Bert et al., 2002), alors que les plantes MET atteignent seulement ce seuil à  $t_5$ . La variabilité interindividuelle est importante à  $t_3$  et  $t_5$  (par exemple, à  $t_3$ : la concentration en Zn mesurée dans les parties aériennes de l'une des plantes est deux fois plus importante que celle mesurée dans les parties aériennes des deux autres plantes formant le triplicat).

En comparaison des concentrations en Cd et en Zn mesurées dans les parties aériennes de *A. halleri* ayant poussé sur des sols dont les teneurs en Cd et en Zn sont proches du fond géochimique (e.g. sol des Hautes Fagnes – tab. II-4, section II.1.4), les concentrations en Cd et Zn accumulées dans les parties aériennes des plantes de l'expérience sont respectivement 10 à 100 fois plus élevées. Ces dernières concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées pour *A. halleri*

ayant poussé sur le sol contaminé de Auby qui présente des teneurs en Cd et en Zn, respectivement, 2 et 5 fois plus élevées que celles présentes dans le pot, (tab.II-4, section II.1.4).

Comme attendu, pour les éléments trace en excès (Cu, Ni, Pb, As), de faibles accumulations sont observées dans les parties aériennes (Fig. II-16 pour Cu, résultats non présentés pour Ni, Pb et As), ce qui est cohérent avec le caractère non accumulateur de *A. halleri* pour ces éléments traces (Dahmani Muller et al., 2001 ; Bert et al., 2002). A notre connaissance, seules des données d'accumulation du Cu sont rapportées dans la littérature. Au cours de notre suivi, la concentration en Cu mesurée dans les parties aériennes est de  $8.7 \pm 2.1 \text{ mg.kg}^{-1}$  ( $n=3 \pm \text{SD}$ ), quelle que soit l'origine de *A. halleri* et quel que soit le temps ( $P>0.05$  - Fig. II-16). Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles des plantes prélevées à Auby et dans les Hautes Fagnes (Tab. II-4, section II.1.4), ou encore celles mesurées par Dahmani Muller et al. (2001), dans les parties aériennes de *A. halleri* cultivées en pot sur sol non pollué.

Les plantes MET et N-MET accumulent autant de Cd malgré une production de biomasse différente. De plus, les plantes N-MET accumulent plus de Zn que les MET alors qu'elles produisent moins de biomasse que les MET. Ces deux observations suggèrent que la production de biomasse et l'accumulation de Zn sont deux paramètres indépendants.

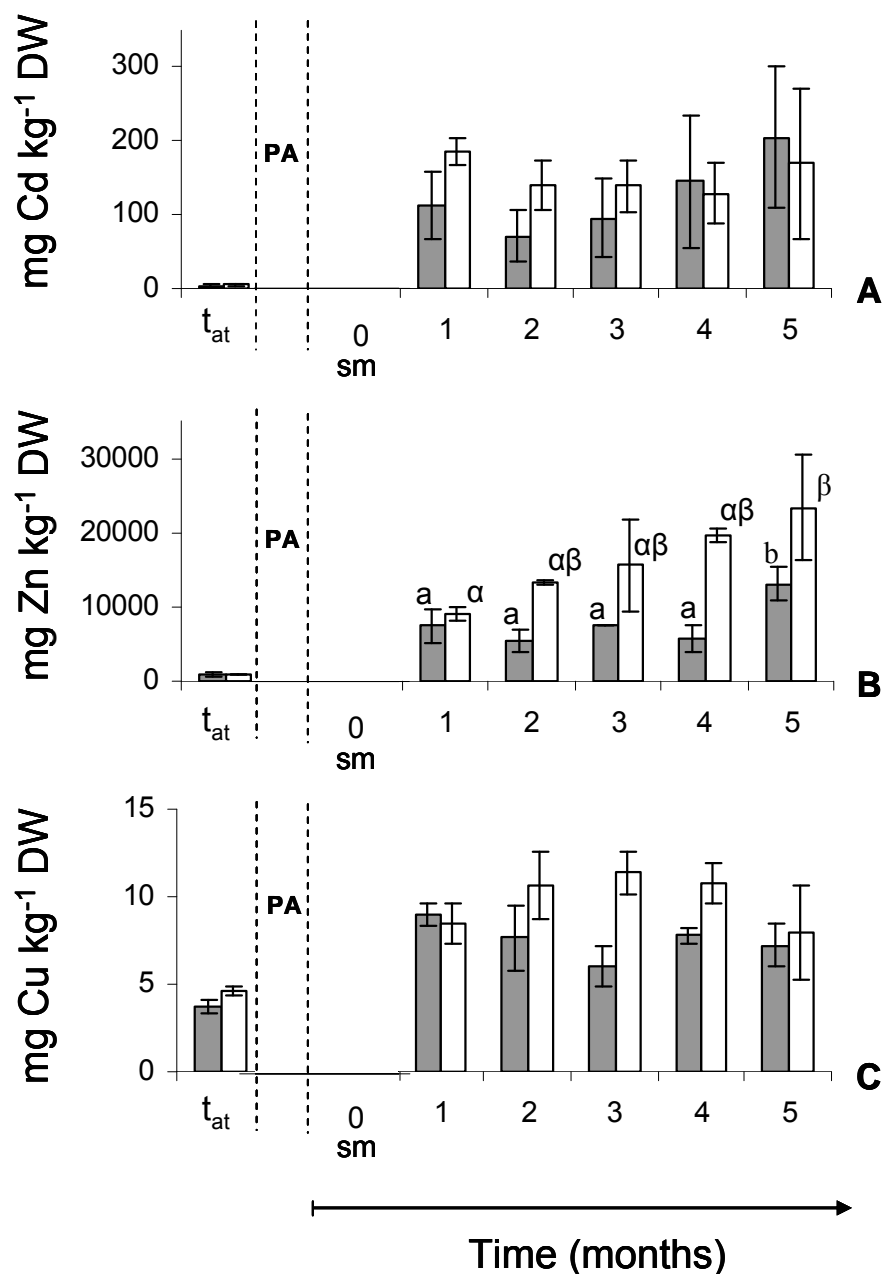


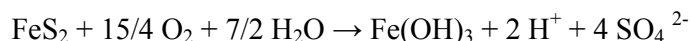
Figure II-16: Concentrations en Cd (A), Zn (B) et Cu (C) [mg.kg<sup>-1</sup>] mesurées dans les parties aériennes de *A. halleri* d'origine MET (gris foncé) et d'origine N-MET (blanc) juste avant le transfert des plantes sur sédiment ( $t_{at}$ ) et pour chaque mois du suivi (moyennes et écart-types réalisés sur 3 échantillons). "PA" signifie "Plant Adaptation" et désigne la période d'adaptation laissée aux plantes pour s'adapter au nouveau substrat. "sm" signifie "start monitoring" et désigne le début du suivi. Pour chaque origine de plante, les résultats des tests statistiques réalisées sur les valeurs de  $t_1$  à  $t_5$  sont indiqués par des lettres de l'alphabet Latin pour les plantes MET et l'alphabet Grec pour les plantes N-MET. Une lettre différente indique une différence significative pour un niveau  $P = 0.05$ .

## II.2.3. Suivi du sédiment

### II.2.3.1. pH et carbone total

#### II.2.3.1.1. pH

Pour les pots témoins de sédiments non végétalisés, une diminution de 0.7 unité pH est observée entre le pH mesuré à  $t_0$  ( $t_{at}$  ;  $7.48 \pm 0.01$ ) et celui mesuré à  $t_6$  ( $6.81 \pm 0.02$ ) (Annexe II-5). Les pots témoins comme les pots végétalisés sont soumis à un arrosage quotidien pour conserver la capacité au champ et à un arrosage mensuel pour collecter les eaux de lixiviation. Cette alternance entre des états plus ou moins humides peut favoriser l'oxydation des sulfures qui génère une acidité. Par exemple, dans le cas de la pyrite, l'équation est la suivante :



Cette oxydation peut être abiotique ou catalysée par les microorganismes présents dans le pot. D'autres processus microbiens (e.g. nitrification, dénitrification) peuvent également agir sur le pH du sédiment. L'activité biologique n'a pas été mesurée dans cette étude.

Les pH mesurés dans le sédiment des pots végétalisés par les plantes MET et N-MET quel que soit le temps de culture ne sont pas significativement différents, (ANOVA à 2 facteurs  $P > 0.05$ ). Il n'y a pas d'*effet origine* sur les mesures de pH (Annexe II-5).

Les pH des pots végétalisés mesurés entre  $t_1$  et  $t_4$  ne sont pas différents du pH du pot témoin mesuré à  $t_i$  (ANOVA 1 facteur  $P > 0.05$  – Annexe II-5). En revanche entre  $t_4$  et  $t_5$ , une diminution de l'ordre de 0.6 unité pH est observée. En effet à  $t_5$ , le pH est mesuré à  $6.86 \pm 0.22$  et  $6.95 \pm 0.03$  pour les MET et N-MET, respectivement. Le pH mesuré à  $t_5$  est donc légèrement plus élevé que celui mesuré à  $t_6$  dans les pots témoins pour N-MET, et pas significativement différent pour les MET (la non significativité du test dans ce cas peut être due au fort écart-type à  $t_5$ ).

En conclusion, la diminution du pH observée n'est pas un *effet des plantes*. L'évolution du pH dépend de nombreux facteurs abiotiques (e.g. teneur en eau du sédiment, température,...) et de facteurs biotiques autre que la plante *sensu stricto* (e.g. développement des microorganismes, de champignons...). On ne peut pas conclure sur

les causes de cette diminution observée aussi bien dans les pots végétalisés que dans les pots témoins.

#### II.2.3.1.2. Carbone total

Les valeurs de carbone total sont du même ordre dans tous les pots de l'expérience (végétalisés ou non) quel que soit le temps (Annexe II-5). Il n'y a ni *effet plante*, ni *effet temps*. Notons que le sédiment étant relativement riche en carbonates, la teneur en carbone total n'est probablement pas affectée par une éventuelle variation de la teneur en carbone organique. Ce dernier paramètre n'a pas été mesuré.

#### II.2.3.2. Concentration pseudo-totales en métaux dans le sédiment

Les concentrations pseudo-totales en métaux présents dans le sédiment mesurées dans tous les pots de l'expérience, végétalisés ou non, quel que soit le temps, sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le sédiment à  $t_{at}$  (résultats non montrés). Les concentrations en métaux dans le sédiment n'évoluent pas, il n'y a ni *effet plante*, ni *effet temps*.

#### II.2.3.3. Concentrations en métaux et sulfates dans les lixiviats

La récolte des lixiviats est faite mensuellement, à partir de "sm" ( $t_0$ ), sur les 3 mêmes pots pour chaque condition. On se propose de suivre l'évolution des concentrations en Cd, Zn et Cu dans les lixiviats au cours du temps.

Pour le Cd, les concentrations dans les lixiviats des pots témoins sont constantes quel que soit le temps ( $P > 0.05$  – fig. II-17) : de l'ordre de  $0.30 \pm 0.07 \text{ mg L}^{-1}$ . En revanche pour les pots végétalisés, une diminution des concentrations en Cd est observée à partir de  $t_2$  et semble se stabiliser en particulier pour les pots végétalisés par N-MET.

Pour le Zn, on retrouve les mêmes tendances que pour le Cd : il n'y a pas d'évolution significative dans les pots témoins, alors qu'en présence de plantes, une diminution des concentrations en Zn est observée entre  $t_0$  et  $t_2$  pour les N-MET et entre  $t_0$  et  $t_3$  pour les MET, puis les concentrations sont stables jusqu'à  $t_5$  (Fig. II-17).

Pour le Cu, les concentrations mesurées entre  $t_0$  et  $t_5$  dans les lixiviats des pots témoins ne montrent pas d'évolution significative ( $P > 0.05$  - Fig. II-17). Pour les pots végétalisés par les MET, l'ANOVA à 1 facteur ne montre pas de différence significative entre les concentrations en Cu des lixiviats en fonction du temps. En revanche, pour les N-MET, les concentrations en Cu semblent suivre le même comportement que pour les autres métaux. Une diminution est observée entre  $t_0$  et  $t_5$ .

Suite à ces observations, il semblerait qu'il y ait un *effet plante* sur les concentrations en Cd, Zn et dans une moindre mesure sur les concentrations en Cu, à partir du deuxième ou troisième mois de culture. Les concentrations en métaux ont diminué et se stabilisent. Cet *effet plante* n'est pas observé dès  $t_0$  malgré une bonne colonisation des racines dans chaque pot végétalisé.

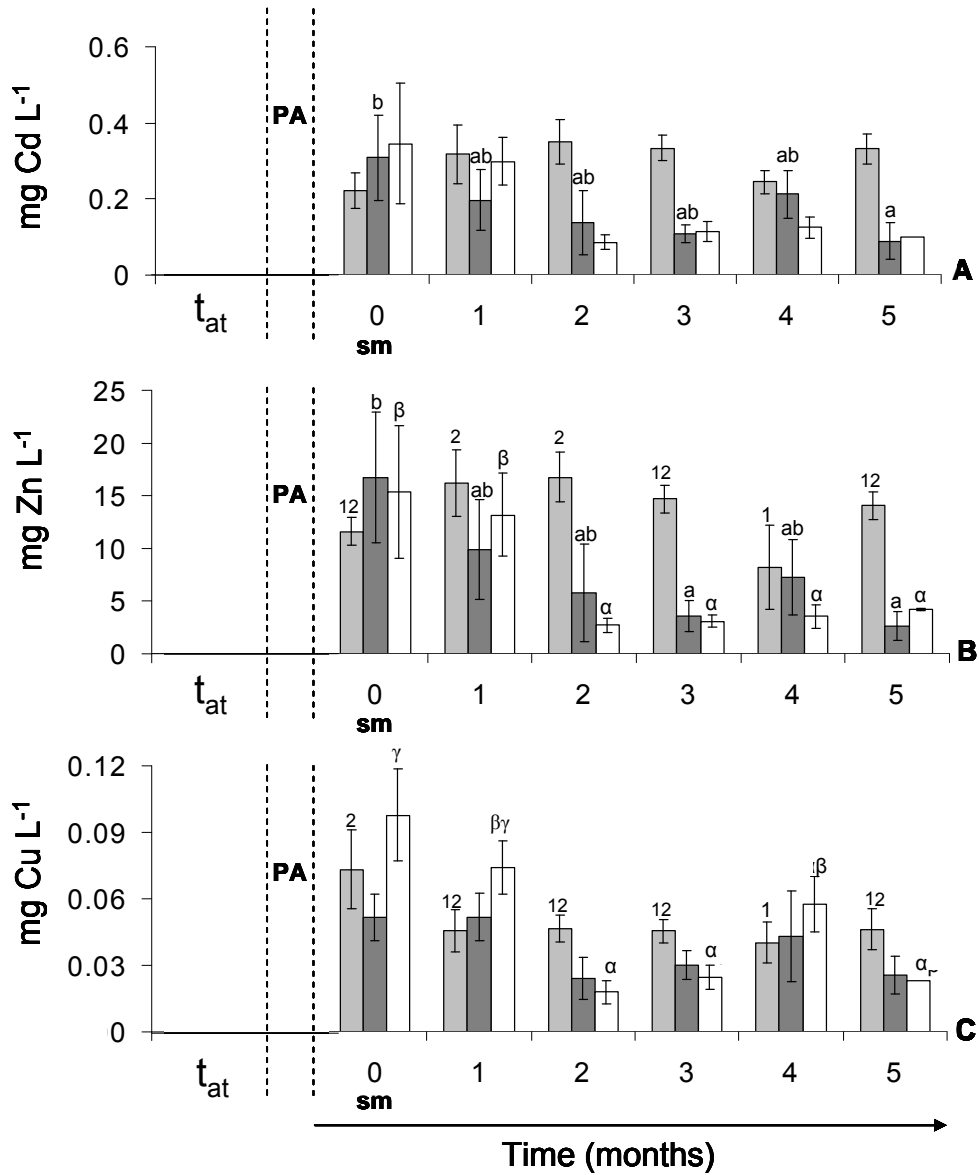


Figure II-17: Concentrations en Cd (A), Zn (B) et Cu (C) [mg.L<sup>-1</sup>] mesurées dans les lixiviats collectés pour les pots non végétalisés (gris clair) et pour les pots végétalisés par *A. halleri* d'origine MET (gris foncé) et N-MET (blanc) (moyenne et écart-type réalisés sur 3 échantillons, excepté à partir de t<sub>2</sub> pour les pots végétalisés par les plantes N-MET, où n=2 car la troisième plante du triplicat est morte). "PA" signifie "Plant Adaptation" et désigne la période d'adaptation laissée aux plantes pour s'adapter au nouveau substrat. "sm" signifie "start monitoring" et désigne le début du suivi. Pour chaque graphe, les résultats des tests statistiques sont symbolisés par des nombres pour les pots non végétalisés, des lettres de l'alphabet Latin pour les pots végétalisés par les plantes MET et par des lettres de l'alphabet Grec pour les pots végétalisés par les plantes N-MET. Un symbole différent indique une différence significative pour un niveau  $P=0.05$ .

Au cours du suivi, les concentrations en sulfates mesurées dans les lixiviats des pots témoins augmentent à partir de  $t_2$  et se stabilisent jusqu'à  $t_5$  ( $P < 0.05$ , fig. II-18). Les concentrations passent d'environ  $950 \text{ mg L}^{-1}$  ( $t_0, t_1$ ) à  $1450 \text{ mg L}^{-1}$  (de  $t_2$  à  $t_5$ ). Pour les pots végétalisés, quelle que soit l'origine, les concentrations en sulfate sont variables et il ne se dégage pas de tendance claire.

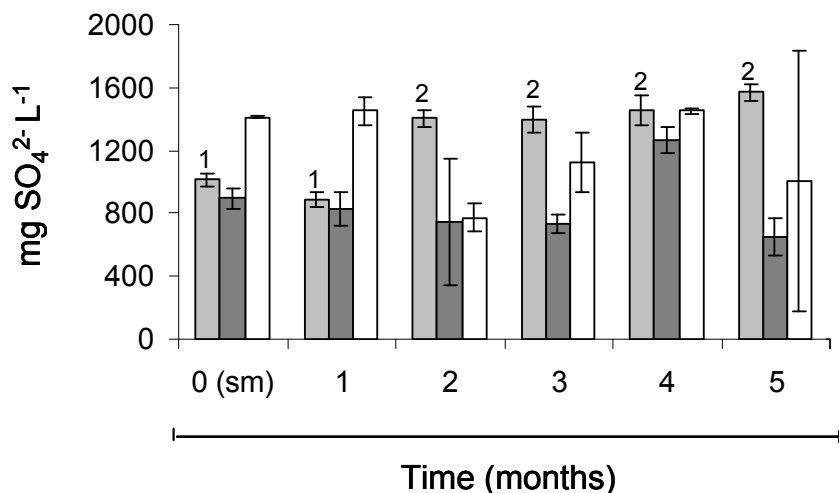


Figure II-18 : Concentrations en sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) [ $\text{mg.L}^{-1}$ ] mesurées dans les lixiviats collectés pour les pots contenant du sédiment non végétalisé (gris clair) et végétalisé par *A. halleri* d'origine MET (gris foncé) et d'origine N-MET (blanc), au cours du suivi, i.e. de "sm" à  $t_5$  (moyenne et écart-type réalisés sur 3 échantillons, excepté à partir de  $t_2$  pour les pots végétalisés par les plantes N-MET, où  $n=2$  car la troisième plante du triplicat est morte). Des tests statistiques sont réalisés sur l'ensemble des valeurs de concentrations mesurées du premier au dernier mois du suivi, pour chaque origine ; mais seuls les résultats statistiques montrant une différence significative au niveau  $P=0.05$  sont mentionnés. Il y a seulement un cas : pour les pots non végétalisés, les résultats des tests statistiques sont symbolisés par des nombres et un nombre différent indique une différence significative pour un niveau  $P=0.05$ .

#### II.2.3.4. Biodisponibilité des métaux

##### II.2.3.4.1. Quantification du pool de métaux échangeables dans le sédiment par extraction chimique au $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ .

Les extractions réalisées à  $t_{at}$  sur le sédiment non végétalisé montrent que la concentration en Cd échangeable du sédiment est de  $1.02 \pm 0.01 \text{ mg kg}^{-1} \text{ PS}$  (valeur  $\pm$  écart-type,  $n=3$ , fig. II-19). A la fin du suivi, i.e. à  $t_6$ , sur ces trois même pots, la



concentration en Cd a diminué de façon significative ( $P < 0.05$  ;  $0.71 \pm 0.03 \text{ mg Cd kg}^{-1}$  PS à  $t_6$ , fig. II-19). Pour les pots végétalisés, les résultats d'une ANOVA à deux facteurs réalisée entre  $t_1$  et  $t_6$  montrent qu'il n'y a ni *effet origine* de la plante, ni *effet temps* sur les concentrations en Cd échangeables ( $P > 0.05$  - fig. II-19).

Le Cu adopte le même comportement que le Cd entre  $t_1$  et  $t_6$ . En effet, la concentration en Cu échangeable diminue (de  $0.68 \pm 0.02 \text{ mg kg}^{-1}$  PS à  $t_1$ , à  $0.18 \pm 0.02 \text{ mg kg}^{-1}$  PS à  $t_6$ , (Fig. II-19). Pour les pots végétalisés, comme précédemment pour le Cd, les résultats d'une ANOVA à deux facteurs réalisée entre  $t_1$  et  $t_6$  montrent qu'il n'y a ni *effet origine* de la plante, ni *effet temps* sur les concentrations en Cu échangeables ( $P > 0.05$  - fig. II-19).

Toutes les concentrations en Cd et en Cu échangeables mesurées dans les pots végétalisés sont significativement différentes de celle mesurée à  $t_{at}$  sur les pots témoins ( $P < 0.05$  - fig. II-19). En revanche, elles ne sont pas significativement différentes de celles mesurées pour les pots témoins en fin de suivi, i.e. à  $t_6$ . Il n'y a donc pas d'*effet plante*. Différents facteurs potentiellement impliqués dans le contrôle du pool de métaux échangeables peuvent être proposés dont des phénomènes abiotiques (e.g. taux d'oxygénation du sédiment, teneur en eau...) et biotiques autres que la plante *sensu stricto* (e.g. développement des microorganismes, champignons).

La concentration en Zn échangeable dans le sédiment des pots témoins est, à  $t_{at}$ , de  $24.0 \pm 0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  PS et à  $t_6$ , elle est de  $26.8 \pm 1.7 \text{ mg kg}^{-1}$  PS (Fig. II-19). De plus, l'ANOVA à deux facteurs réalisée entre  $t_1$  et  $t_6$  réalisée sur les concentrations en Zn échangeable montre qu'il n'y a pas d'*effet origine* ( $P > 0.05$  - fig. II-19) mais qu'il y a un *effet temps* ( $P < 0.01$  - fig. II-19). Entre  $t_1$  et  $t_5$ , quelle que soit l'origine, les concentrations en Zn échangeable ont diminué, alors qu'elles avaient augmenté entre  $t_{at}$  et  $t_6$  dans les pots témoins.

Les concentrations en Zn échangeable sont plus élevées à  $t_1$  dans les pots végétalisés qu'à  $t_{at}$  dans les pots témoins ( $P < 0.05$  - fig. II-19). Elles diminuent entre  $t_1$  et  $t_5$  pour les pots végétalisés par les plantes MET ( $14.8 \pm 2.3 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  PS, fig. II-19) et entre  $t_1$  et  $t_4$  pour les pots végétalisés par les plantes N-MET ( $17.0 \pm 1.1 \text{ mg Zn kg}^{-1}$  PS, fig. II-19). Ces valeurs minimales sont inférieures à celles mesurées à  $t_{at}$  et  $t_6$  sur sédiment non végétalisé. Dans le cas du Zn, la plante semble donc jouer un rôle prépondérant sur

le pool échangeable en Zn par rapport aux autres phénomènes. L'effet plante observé sur les concentrations en Zn échangeable peut s'expliquer par la capacité d'*A. halleri* à accumuler plus de Zn que de Cd et de Cu.

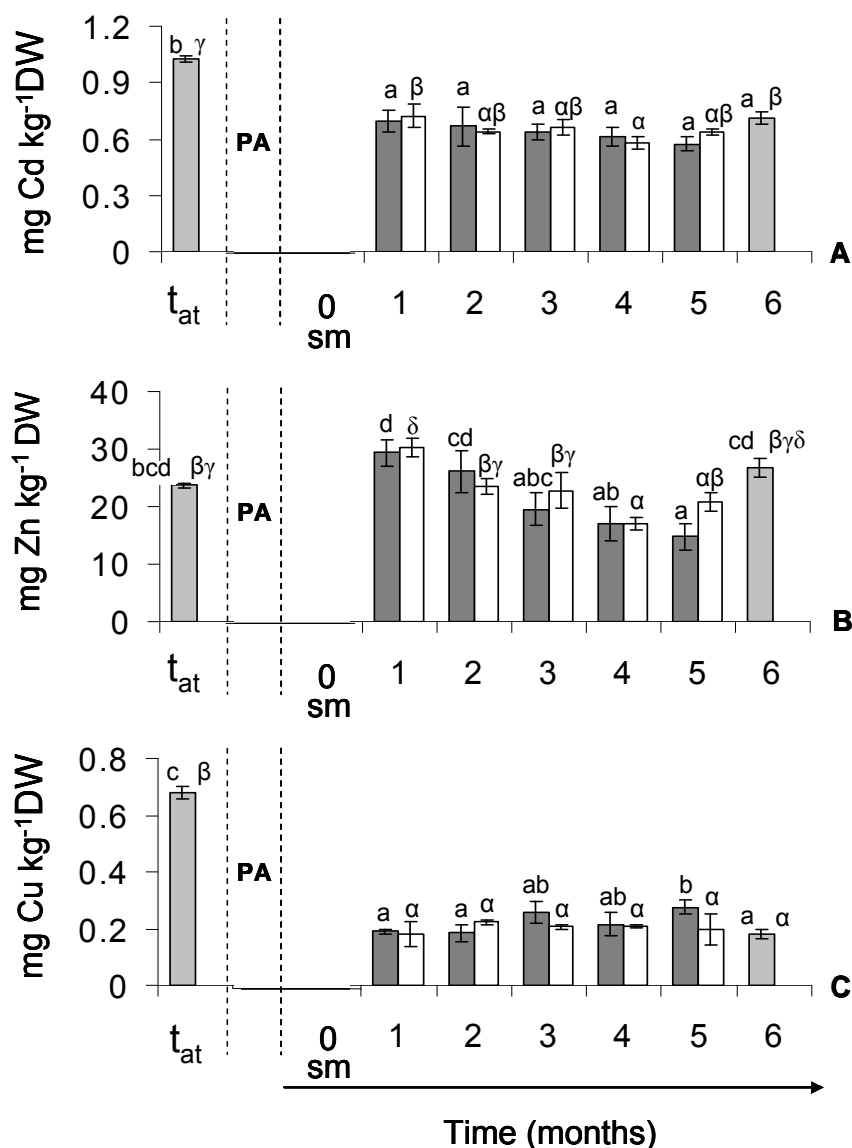


Figure II-19 : Concentrations en Cd (A), Zn (B) et Cu (C) échangeables [mg.kg<sup>-1</sup>] dans le sédiment végétalisé par les plantes MET (gris foncé) et par les plantes N-MET (blanc) de *t*<sub>1</sub> à *t*<sub>5</sub>, et dans le sédiment des pots témoins (non végétalisés) (gris clair) seulement à *t*<sub>1</sub> et *t*<sub>6</sub> (moyenne ± écart-type réalisés sur 3 échantillons. “PA” signifie “Plant Adaptation” et désigne la période d’adaptation laissée aux plantes pour s’adapter au nouveau substrat. “sm” signifie “start monitoring” et désigne le début du suivi. Pour chaque graphe, les résultats des tests statistiques sont symbolisés par des lettres de l’alphabet Latin pour les pots végétalisés par les plantes MET + les pots témoins (*t*<sub>at</sub> et *t*<sub>6</sub>) et par des lettres de l’alphabet Grec pour les pots végétalisés par les plantes N-MET + les pots témoins (*t*<sub>at</sub> et *t*<sub>6</sub>). Un symbole différent indique une différence significative pour un niveau *P* = 0.05.

#### II.2.3.4.2. Quantification des métaux phytodisponibles par application de DGT.

Dans cette étude nous avons testé la méthode DGT pour quantifier le pool en métaux phytodisponibles sur une partie seulement des échantillons (sédiment à  $t_{at}$  et sédiment végétalisé par *A. halleri* pour les deux origines à  $t1$ ,  $t2$ ,  $t4$  et  $t5$  - Fig. II-20).

Quelle que soit l'origine de *A. halleri*, il n'y a pas de différence significative entre les concentrations en Cd et en Cu phytodisponibles mesurées pour le sédiment non végétalisé à  $t_i$  et celles mesurées dans le sédiment végétalisé quel que soit le temps du suivi (Fig. II-20). N'ayant pas de mesures pour le sédiment non végétalisé au cours et/ou à la fin du suivi, il est difficile de conclure sur un potentiel *effet plante* sur les concentrations en Cd et Cu phytodisponibles pour la plante.

Les concentrations en Cd et Cu phytodisponibles mesurées entre  $t1$  et  $t5$  dans les pots végétalisés par les plantes MET ne sont pas différentes de celles mesurées dans les pots végétalisés par les plantes N-MET (Fig. II-20). L'origine d'*A. halleri* n'influe pas sur les concentrations en Cd et Cu phytodisponibles dans le sédiment.

Pour le Zn, entre  $t1$  et  $t5$ , les concentrations en Zn phytodisponible mesurées dans les pots végétalisés par les plantes N-MET diminuent à partir de  $t4$  et sont légèrement plus faibles que celles mesurées à  $t_i$  dans les pots non végétalisés (Fig. II-20). Pour les pots végétalisés par les plantes MET, les concentrations à  $t4$  et  $t5$  sont inférieures à celle mesurées à  $t1$  et  $t2$  (Fig. II-20). On pourrait donc parler d'un *effet origine* des plantes. Cependant, n'ayant pas de données pour le reste du suivi pour les pots non végétalisés il est difficile de conclure sur l'impact de la plante ou l'impact des facteurs abiotiques et biotiques décrits auparavant, intervenant dans le pot.

La DGT permet la mesure des ions libres métalliques, ainsi que les complexes inorganiques et les complexes organiques solubles, excluant ainsi les particules et les colloïdes. Le pool de métaux phytodisponibles peut inclure le pool de métaux échangeables. Mais la DGT prend aussi en compte la modification des équilibres s'effectuant dans le substrat sur un temps donné. Bien que ces deux méthodes ne mesurent pas la même chose (les unités sont différentes), on retrouve les mêmes tendances au niveau des résultats.

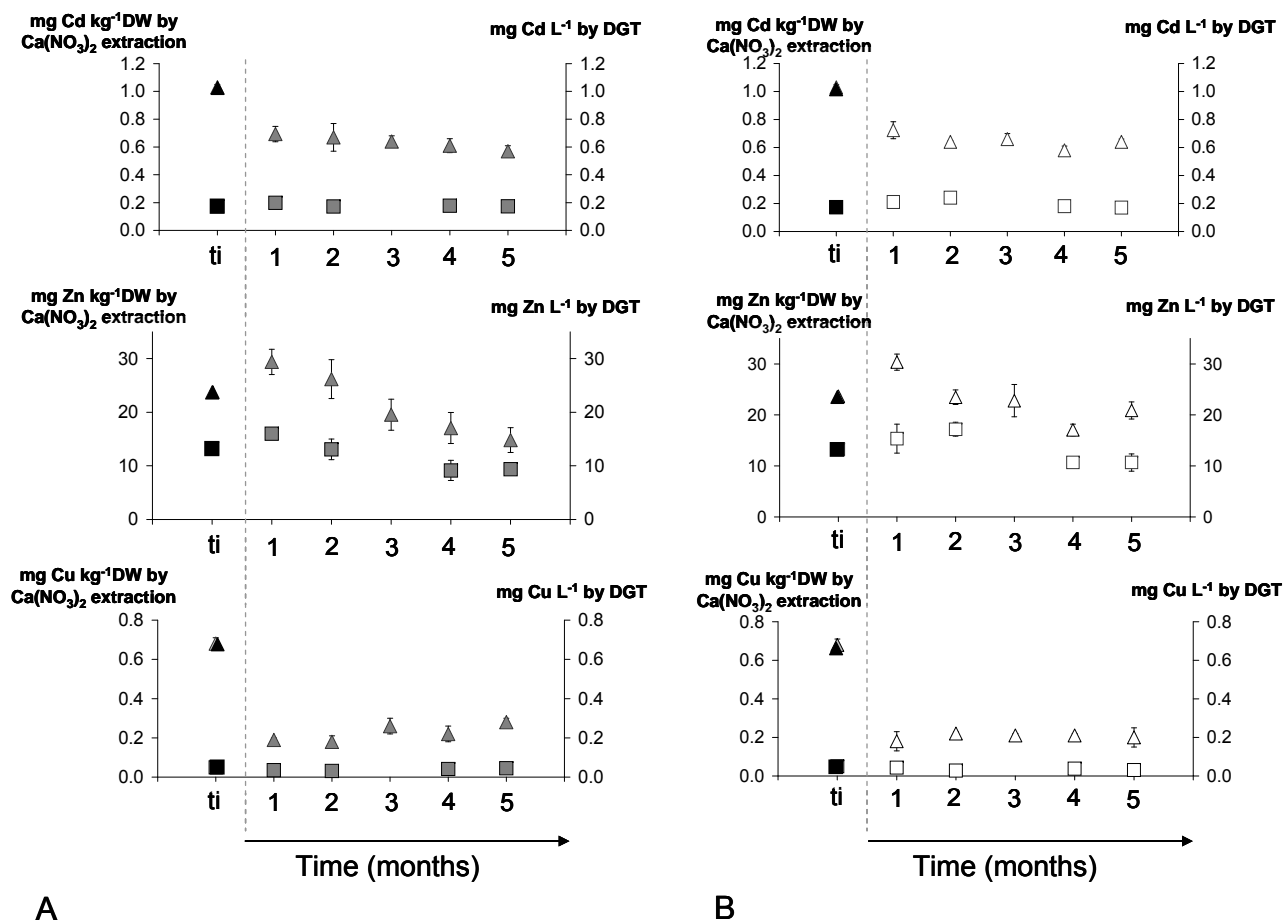


Figure II-20 : Concentrations en Cd, Zn et Cu échangeables (triangle - [mg.kg<sup>-1</sup>]) et phytodisponibles (carré - [mg.L<sup>-1</sup>]) dans le sédiment végétalisé par (A) les plantes MET (gris foncé) et (B) les plantes N-MET (blanc), de *t*<sub>1</sub> à *t*<sub>5</sub>. Les concentrations mesurées à *t*<sub>0</sub> dans le sédiment des pots témoins (non végétalisés - noir) sont représentées sur graphes pour les deux origines. Moyenne et écart-type réalisés sur 3 échantillons.

## II.2.4. Discussion

### II.2.4.1. Paramètres de croissance des plantes

Les résultats de la mesure de biomasse montrent que *A. halleri*, quelle que soit son origine, se développe sur sédiment et que les N-MET produisent moins de biomasse que les MET pendant tout le temps de l'expérience. Les deux origines peuvent avoir une physiologie différente conduisant à des productions de biomasse différentes (la culture sur terre agricole ne permet pas de conclure car les plantes ne se sont pas bien adaptées à ce substrat), ou bien les plantes N-MET peuvent être moins bien adaptées aux conditions du sédiment et/ou moins tolérantes aux métaux contenus dans le sédiment que les plantes MET.

Dans la littérature, la mesure de biomasse est l'un des paramètres permettant l'estimation de la tolérance d'une plante à un stress. Dans notre étude, le stress en question est la forte teneur en métaux présents dans le sédiment. Pauwels et al., (2006) ont testé la tolérance au Zn en culture hydroponique de différentes populations européennes d'*A. halleri* d'origines MET et N-MET. Les plantes MET sont plus tolérantes que les N-MET et il existe une gamme continue de variation de la tolérance allant des populations N-MET aux populations MET (Pauwels et al., 2006). Par contre, il convient de noter que dans cette expérience, nous ne travaillons ni en hydroponie, ni avec une pollution « mono-métallique ». Le sédiment étudié est un substrat complexe renfermant de nombreux polluants métalliques (Cd, Zn, Cu, Pb, ...).

La présence d'une population métallicole sur un ancien site de dépôt de sédiment très fortement contaminé par les métaux est reportée dans le nord de la France. Par contre, à notre connaissance, la présence de population naturelle ou naturalisée non métallicole sur sédiment n'est pas rapportée dans la littérature.

Sur un sédiment identique à celui utilisé dans ce travail (homogénéisé mécaniquement mais non broyé et tamisé), une expérience en pot a été menée par Lacherez (2007) sur des plantes d'origine MET (Auby) et N-MET (Hautes-Fagnes). Après une année de développement dans des pots placés en extérieur, les plantes (5 pots par origine) ont été fauchées au moment de la floraison et leurs biomasses respectives mesurées. La

biomasse moyenne des plantes d'origine MET était de 93g (poids frais) et celle des plantes d'origine N-MET était de 6g (poids frais).

Sur les sites de prélèvement des graines, les observations montrent que les plantes des Hautes-Fagnes sont généralement rampantes, de petites tailles et forment des tapis qui ne fleurissent pas toujours tandis que les plantes d'Auby, bien que formant aussi des tapis, ont un port moins rampant, plus souvent dressé, avec des tiges florifères nombreuses et de grande taille.

Les principales caractéristiques du sédiment sont intermédiaires entre celles du sol d'Auby (origine MET) et du sol des Hautes Fagnes (origine N-MET), à l'exception de la teneur en matière organique qui est plus faible que dans les deux sols et du pH, qui est légèrement plus acide pour les sols que pour le sédiment (Tab. II-3). Cependant, d'autres paramètres abiotiques et biotiques, comme la texture, la porosité ou encore la structuration en agrégats ou pas, le potentiel redox, la phytodisponibilité des éléments nutritifs (concentrations en cations majeurs dans le sédiment), l'activité microbiologique et/ou les processus microbiens dans le substrat, etc..., pourraient expliquer la plus ou moins bonne adaptation des plantes, notamment des plantes N-MET.

Au cours de cette expérience en pot, des pots de contrôle de culture sur sol non contaminé ont été préparés avec de la terre agricole, très argileuse et ni les plantes MET, ni les plantes N-MET ne se sont développées sur ce sol au cours du temps (Tab. II-5).

Tableau II-5 : Biomasse (g) des parties aériennes de *A. halleri* d'origine MET et N-MET juste avant le transfert des plantes sur sédiment (*t*0) et à la fin de l'expérience sur sol agricole (*t*6). Moyenne et écart-type réalisés sur 5 échantillons).

Temps de culture	Biomasse (g) poids sec	
	Plantes MET	Plantes N-MET
<i>t</i> 0	2.7 ± 1.2	2.7 ± 1.7
<i>t</i> 6	2.8 ± 1.7	1.0 ± 0.4

#### II.2.4.2. Accumulation du Cd et du Zn dans les parties aériennes de la plante

*A. halleri* est considérée comme hyperaccumulatrice de Zn et de Cd. Le statut hyperaccumulateur de Zn et de Cd de populations MET a souvent été rapporté (Kupper et al., 2000 ; Zhao et al., 2000 ; Roosens et al., 2008). En revanche, peu d'études l'ont prouvé pour les populations N-MET (Bert, 2000 et Bert, 2002). La plupart des études sont menées sur le Zn et non sur le Cd.

Dans notre étude, les résultats d'accumulation du Zn montrent d'une part, qu'il y a un *effet origine* sur les concentrations en Zn mesurées dans les parties aériennes de *A. halleri* : les plantes N-MET accumulent plus de Zn que les plantes MET.

Pour le Cd, ni l'*effet origine*, ni l'*effet temps* ne sont observés sur les concentrations en Cd dans les parties aériennes de *A. halleri*.

L'*effet origine* mis en évidence sur les concentrations en Zn dans les parties aériennes de *A. halleri* est aussi observé par Bert et al. (2000) qui montraient que les populations d'*A. halleri* d'origine N-MET accumulaient plus de Zn que celles d'origine MET. Il convient de noter que les plantes utilisées dans l'expérience de Bert et al. (2000) sont différentes des nôtres. La même observation a été rapporté pour *Thlaspi caerulescens* (Lloyd-Thomas, 1995, Meerts & Van Isacker, 1997, Lombi et al., 2000), avec des concentrations en Zn jusqu'à trois fois plus grandes pour les plantes d'origine N-MET (Meerts & Van Isacker, 1997).

Lacherez (2007), sur le même matériel végétal et le même sédiment placés en conditions extérieures pendant une année avant la mesure des concentrations, a montré que la concentration en zinc était équivalente entre les deux origines. Une seconde mesure effectuée sur les mêmes plantes un mois après la première a montré que la concentration en Zn était alors supérieure chez les plantes MET. Concernant le Cd, les plantes d'origine N-MET accumulaient plus que les plantes d'origine MET.

Le fait qu'il n'y ait pas d'*effet temps* sur les concentrations en Cd dans les parties aériennes de *A. halleri* pourrait traduire le fait que les plantes ont atteint un maximum d'accumulation pour ces métaux dès les premiers mois du suivi. Ce phénomène de plateau d'accumulation du Cd dans les parties aériennes des plantes a déjà été observé auparavant pour d'autres plantes non accumulatrices (e.g. radis (Hamon et al., 1999),

maïs (Logan et al., 1997)) et hyperaccumulatrices (Yang et al., 2006). Il peut s'expliquer par les facteurs limitants soit du substrat (e.g. faible biodisponibilité des métaux (Luo & Christie, 1998), réactions de précipitation (Christensen & Tjell, 1984), etc...), soit de la plante (limitation de la translocation des métaux des racines ou de leur entrée via un mécanisme de saturation de la surface des racines dans le cas des non accumulatrices, Hamon et al., 1999). Mais dans notre étude, l'hypothèse de la « réponse plateau » est à modérer car les écart-types sont grands. D'ailleurs, ce plateau n'est pas observé pour les plantes N-MET (pour laquelle les écarts-types sont relativement grands à t3 et t5, Fig. II-16). Ces grands écarts types peuvent être dus à la variabilité individuelle (analyses effectuées sur 3 individus différents). En effet, au sein d'une même population prélevée sur le terrain, on observe des variations quantitatives de l'accumulation de Cd, même si celle de Zn semble plus homogène (Bert et al., 2002). Dans notre cas, la variabilité individuelle semble donc plus grande que la variation due à l'évolution au cours des mois.

Les plantes cultivées sur le sédiment contiennent entre 100 à 200 mg Cd kg<sup>-1</sup> dans les parties aériennes. Des concentrations bien supérieures sont mesurées dans les plantes cultivées en hydroponie (environ 1500 mg kg<sup>-1</sup> PS pour des plantes cultivées pendant 9 semaines sur une solution contenant 20μM de Cd - résultats de l'expérience en hydroponie - section III.1.4.2). Pour une concentration en Cd plus élevée dans la solution hydroponique, i.e. 100 μM et pour un temps de culture plus long, i.e. 14 semaines, *A. halleri* peut accumuler jusqu'à 6000 mg Cd kg<sup>-1</sup> dans ses parties aériennes (Küpper et al., 2000). De même pour le Zn, *A. halleri* présente des concentrations de plus de 32 000 mg Zn kg<sup>-1</sup> après 4 semaines sur une solution contenant 1000 μM de Zn (Zhao et al., 2000) et environ 9000 mg Zn kg<sup>-1</sup> PS après 9 semaines sur une solution contenant 300μM de Zn (résultats de l'expérience en hydroponie - section III.1.4.2). La comparaison des teneurs en Cd mesurées en hydroponie et sur sédiment indique que l'accumulation est limitée dans ce dernier substrat. Plusieurs facteurs limitants peuvent être proposés : Tout d'abord, même si la quantité de Cd par kg de sédiment est supérieure à celle par litre de solution hydroponique, le pool phytodisponible est probablement nettement supérieur pour la culture hydroponique (Christensen & Tjell, 1984, Chaney & Ryan, 1993, Dahmani-Muller et al., 2000, McGrath et al., 2006). Ensuite, l'accumulation par la racine peut être limitée par la diffusion, qui est nettement plus faible dans un substrat solide par rapport à une solution. Des phénomènes de



compétition avec les autres cations présents dans le sédiment (Zn, Pb, Ca, ...) peuvent également limiter l'entrée du Cd dans la racine.

Les plantes N-MET, qui produisent moins de biomasse que les MET, accumulent plus de Zn. La production de biomasse et l'accumulation de Zn semblent être deux paramètres indépendants.

La production de biomasse peut être, au moins en partie, liée à la tolérance aux métaux présents dans le sédiment (Cd, Zn, etc.). La tolérance et l'accumulation du Zn chez *A. halleri* sont deux caractères indépendants (Bert et al., 2000). Il n'est donc pas surprenant que la production de biomasse et les concentrations en Zn ne soient pas liées.

Un autre paramètre pertinent pour la comparaison entre les deux origines d'*A. halleri* est la quantité de Cd et Zn extraite par plante. Ce point est abordé plus loin (cf section II.2.4.4).

#### **II.2.4.3. Biodisponibilité des métaux**

Les concentrations des pools de Cd échangeable et phytodisponible mesurées au cours de notre expérience sont du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature et qui ont été mesurées selon les mêmes méthodes mais bien souvent pour des conditions de culture différentes (concentrations en métaux plus faibles dans les sols étudiés, temps de culture différents) pour d'autres plantes hyperaccumulatrices (e.g. *Thlaspi caerulescens*, Koopmans et al., 2008) et pour des plantes non hyperaccumulatrices (l'épinard, Almas et al., 2006 ; *Lolium perenne*, Koopmans et al., 2008 ; le blé, Nolan et al., 2005 ; la laitue, Cornu & Denaix, 2006).

Bien que les pools de métaux échangeables et phytodisponibles ne se recouvrent pas complètement, on note plusieurs points communs pour les résultats obtenus dans notre étude. Tout d'abord, pour les deux méthodes, les mêmes tendances sont observées : une baisse des pools de Zn échangeable et phytodisponible au cours des derniers mois du suivi pour les deux origines, alors que les pools de Cd et Cu échangeables et phytodisponibles n'évoluent ni en fonction du temps, ni en fonction de l'origine de *A. halleri*. Ensuite, pour les deux méthodes les écart-types sont relativement faibles, ce qui indique une faible variabilité d'un pot à l'autre pour ces pools.

Dans les sédiments, les métaux tels que le Cd et le Zn sont majoritairement précipités sous forme de sulfure de par la forte présence de sulfures (O'Day et al., 1998 ; Carroll et al., 2002 ; Isaure et al., 2001). Cependant, l'exposition aux conditions atmosphériques, l'arrosage et la mise en culture du sédiment entraînent nécessairement des changements des conditions redox (Tack et al., 1996 ; Simpson et al., 1998). Par exemple, le développement racinaire peut entraîner une aération du sédiment. Les sulfures métalliques peuvent alors s'oxyder, libérer les métaux qui peuvent ensuite former des phases secondaires.

Dans une étude sur un sédiment contaminé soumis à une expérience de phytostabilisation de deux ans par des graminées, Panfili et al. (2004) ont montré une évolution considérable de la spéciation du Zn. Le Zn initialement présent sous forme de sphalérite (ZnS) a totalement été oxydé et d'autres phases zincifères, telles que des phosphates de zinc, des phyllosilicates zincifères et/ou de l'hydrotalcite se sont formées. Ces phases néoformées indiquent que le Zn dans le sédiment phytostabilisé est sous une forme plus stable que dans le sédiment non végétalisé (présence résiduelle de ZnS).

Ce changement de spéciation du Zn peut être aussi induit par des facteurs autres que le développement d'une plante, comme par exemple une phase de lixiviation, l'alternance périodique des phases de séchage (Isaure et al., 2000) et humidification du sédiment, l'activité bactérienne et/ou fongique (Marschner et al., 1995), etc...

D'autre part, le sédiment que nous étudions est relativement riche en matière organique. On peut alors envisager le fait qu'une partie des métaux soit complexée avec des substances humiques qui composent la matière organique du sédiment. Les substances humiques contiennent de nombreux groupes fonctionnels (OH, COOH, C=O) susceptibles de complexer les cations métalliques (Sposito, 1989). Ainsi ces complexes peuvent être considérés comme des phases réduisant la mobilité des métaux. Il est donc possible que ce phénomène se soit produit dans nos pots de culture.

#### **II.2.4.4. Bilan de matière**

A partir des résultats de biomasse et de concentrations en métaux dans les parties aériennes de *A. halleri*, dans les lixiviats et dans le sédiment, nous avons établi un bilan massique de la quantité de métaux extraite par les plantes, de la quantité de métaux

lixiviés ainsi que la quantité de métaux toujours présente dans le pot de sédiment (Tab. II-6).

#### II.2.4.4.1. Cd et Zn lixiviés

Nos résultats semblent montrer un *effet plante* induisant une diminution des concentrations en Cd, Zn et Cu mesurées dans les lixiviats, à partir du deuxième ou troisième mois de culture d'*A. halleri* sur le sédiment. En revanche, les résultats d'une étude menée sur un sédiment de curage contaminé en métaux, végétalisé par du maïs (*Zea mais*), du colza (*Brassica napus*), de l'ivraie (*Lolium perenne*) et cultivé pendant 4 mois, montre qu'en présence de plantes les concentrations en Cd, Zn et Cu contenu dans les lixiviats sont plus élevées que celles mesurées dans les lixiviats des pots sans plante (Marseille et al., 2000). Les auteurs mettent en évidence un *effet plante* « inverse » à celui observé au cours de notre expérience. Cette différence d'évolution des concentrations en métaux dans les lixiviats est soit due aux caractéristiques de la plante (e.g. caractère hyperaccumulateur/non-hyperaccumulateur, physiologie, développement racinaire, microbiote associé à chaque espèce de plante) ; soit due à la spéciation des métaux dans le sédiment qui conditionne leur biodisponibilité. Le sédiment étudié par Marseille et al. (2000) provient aussi de la Scarpe et présente des caractéristiques similaires aux nôtres, et donc une spéciation des métaux probablement comparable. Donc la première hypothèse semble plus plausible.

L'autre résultat intéressant observé sur les lixiviats est que la quantité de métaux entraînée lors des lixiviations est très faible en comparaison des quantités en métaux présentes dans le pot initialement. Après 5 mois de culture, soit 5 mois d'arrosage régulier et 5 lixiviations, la quantité de Cd lixivié est de  $0.55 \pm 0.08$  mg Cd pot<sup>-1</sup> (Tab. II-6), quelle que soit l'origine d'*A. halleri*, ce qui représente 0.01% du Cd total. De même, à t5 et quelle que soit l'origine de *A. halleri*, les quantités de Zn et de Cu mesurées dans les lixiviats sont respectivement de  $23.0 \pm 3.9$  mg Zn pot<sup>-1</sup> et  $0.15 \pm 0.02$  mg Cu pot<sup>-1</sup>, soit 0.02 % et 0.006 % de Zn et de Cu totaux. Pour un substrat différent tel que de la tourbe métallifère contaminée en Zn (7060 mg kg<sup>-1</sup>) McBride et al. (2006) ont rapporté que la perte en Zn dans les lixiviats occasionnée par 6 lixiviations représentait environ 1% du Zn total. La tourbe métallifère étudiée a été caractérisée comme très riche en S, et la quantité de S lixivié n'excédait pas 3%. Le Zn est associé au S, et forme

une nouvelle phase stable dans le sédiment. De plus, les auteurs ont mis en évidence que la lixiviation du Zn est plus importante que celle du Cd.

Tableau II-6 : Distribution massique du Cd, Zn et Cu entre les matrices étudiées : le sédiment ( $2800 \pm 1$  g par pot,  $n=39$ ), les parties aériennes des plantes et les lixiviats avant et pendant la culture d' *A. halleri* pour les deux origines.

	Mois	Métaux dans le sédiment (mg)		Métaux dans les parties aériennes des plantes (mg)		Métaux dans les lixiviats (mg) [somme cumulée]	
		MET	N-MET	MET	N-MET	MET	N-MET
<b>Cd</b>							
$t_{at}$		394 ± 67 (3)		0.013 ± 0.011	0.005 ± 0.001		
0	(sm)					0.17 ± 0.08 (3)	0.22 ± 0.13 (3)
1		348 ± 20	382 ± 10	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.6	0.27 ± 0.07 (6)	0.31 ± 0.11 (6)
2		380 ± 13	377 ± 20	1.6 ± 0.8	1.7 ± 1.0	0.33 ± 0.08 (9)	0.35 ± 0.11 (8)
3		370 ± 10	374 ± 9	3.1 ± 1.5	1.3 ± 1.3*	0.37 ± 0.07 (12)	0.39 ± 0.10 (10)
4		356 ± 9	362 ± 9	3.9 ± 2.9	1.8 ± 0.8	0.54 ± 0.08 (15)	0.47 ± 0.09 (12)
5		359 ± 42	341 ± 8	3.0 ± 1.0	1.0 ± 0.7	0.58 ± 0.08 (18)	0.52 ± 0.09 (16)
<b>Zn</b>							
$t_{at}$		11407 ± 784 (3)		0.296 ± 0.195	0.100 ± 0.013		
0	(sm)					9.3 ± 4.6 (3)	9.6 ± 5.5 (3)
1		10057 ± 590	10823 ± 205	110 ± 21	68 ± 43	14.3 ± 4.1 (6)	14.0 ± 4.7 (6)
2		10688 ± 303	10714 ± 610	127 ± 34	155 ± 59	16.9 ± 4.3 (9)	15.2 ± 4.8 (8)
3		10180 ± 375	10847 ± 586	250 ± 37	175 ± 212*	18.2 ± 4.0 (12)	16.4 ± 4.6 (10)
4		9947 ± 160	9889 ± 290	135 ± 28	272 ± 66	23.5 ± 3.9 (15)	18.4 ± 4.3 (12)
5		11606 ± 1141	11055 ± 150	275 ± 77	197 ± 150*	24.8 ± 3.7 (18)	21.3 ± 4.0 (16)
<b>Cu</b>							
$t_{at}$		652 ± 25 (3)		0.011 ± 0.003	0.005 ± 0.001		
0	(sm)					0.028 ± 0.009 (3)	0.060 ± 0.023 (3)
1		589 ± 39	591 ± 18	1.0 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0.054 ± 0.007 (6)	0.083 ± 0.025 (6)
2		596 ± 24	594 ± 23	0.6 ± 0.4	1.4 ± 0.2	0.063 ± 0.011 (9)	0.090 ± 0.026 (8)
3		586 ± 16	581 ± 3	0.6 ± 0.4	1.6 ± 0.3	0.074 ± 0.010 (12)	0.122 ± 0.024 (10)
4		577 ± 24	569 ± 4	1.2 ± 0.8	1.4 ± 0.6	0.108 ± 0.014 (15)	0.153 ± 0.022 (12)
5		687 ± 58	662 ± 46	1.5 ± 0.9	1.5 ± 1.0	0.122 ± 0.013 (17)	0.175 ± 0.020 (16)

Pour les métaux présents dans le sédiment et les parties aériennes, les valeurs sont des moyennes  $\pm$  écart-types réalisés sur 3 échantillons. Les lixiviats ont été mesurés dans le même pot à tous les temps d'échantillonnage. Les valeurs indiquées sont la somme cumulée de la quantité de métaux trouvés dans les lixiviats à chaque temps d'échantillonnage (moyennes  $\pm$  écart-types réalisés sur (n) échantillons).

\* Les forts écart-types sont dus à de grandes différences au niveau des biomasses et/ou des concentrations en métaux entre les 3 réplicats.

#### II.2.4.4.2. Phytoextraction du Cd et du Zn

À  $t_{at}$ , c'est-à-dire avant culture par *A. halleri*, les métaux sont présents à hauteur de  $394 \pm 67$  mg Cd pot<sup>-1</sup>,  $11\,407 \pm 784$  mg Zn pot<sup>-1</sup> et  $652 \pm 25$  mg Cu pot<sup>-1</sup> (Tab. II-6).

Placées dans des conditions optimales en chambre de culture, les plantes, quelle que soit leur origine, ont extrait, après 1 mois de culture,  $1,5 \pm 0,6$  mg Cd pot<sup>-1</sup>. Après 5 mois de culture, les plantes MET ont extrait  $3,0 \pm 1,06$  mg Cd pot<sup>-1</sup> alors que les plantes N-MET ont extrait  $1,0 \pm 0,7$  mg Cd pot<sup>-1</sup> (Tab. II-6). Pour les plantes MET, le rendement d'extraction semble augmenter avec le temps. En revanche, l'extraction du Cd par les plantes N-MET est plus faible et n'évolue pas au cours du temps du fait de leur croissance plus limitée dans cette expérience.

Les plantes MET ont extrait  $110 \pm 21$  et  $275 \pm 77$  mg Zn pot<sup>-1</sup> à  $t1$  et  $t5$  respectivement (Tab. II-6). Les plantes N-MET ont extrait  $68 \pm 43$  et  $197 \pm 150$  mg Zn pot<sup>-1</sup> à  $t1$  et  $t5$  respectivement (Tab. II-6). Ces dernières valeurs présentent de forts écart-types. Par exemple, parmi les plantes N-MET composant le triplicat analysé à  $t5$ , deux d'entre elles ont extrait 211 et 339 mg Zn pot<sup>-1</sup> alors que la troisième n'a extrait que 40,8 mg Zn pot<sup>-1</sup> (Tab. II-6). Encore une fois, cela est attribué à la variabilité individuelle qui existe au sein d'une même population. Malgré ces grands écart-types, on observe une augmentation de l'extraction de Zn avec le temps. En revanche, les quantités de Cu extraites par *A. halleri*, quelle que soit l'origine, n'augmentent pas au cours du temps et sont de l'ordre de  $1,0 \pm 0,6$  mg Cu pot<sup>-1</sup> pour les plantes MET et de  $1,5 \pm 0,5$  mg Cu pot<sup>-1</sup> pour les plantes N-MET (Tab. II-6).

Les forts rendements de phytoextraction sont obtenus pour des sédiments faiblement à modérément contaminés (Vangronsveld et al., 2009 – *in press*). Même si le sédiment choisi pour cette étude est fortement contaminé en Cd et Zn et se prête mal à un traitement de phytoextraction (voir les critères de choix de ce sédiment section II.1.1.1), nous avons calculé les rendements d'extraction. Chaque plante MET a extrait moins de 1 % du Cd initial, et pour les plantes N-MET, ce même pourcentage est inférieur à 0,5 %. Dans le cas du Zn, chaque plante a extrait moins de 3 % du métal pour les plantes MET et 2,5 % pour les N-MET. Ces rendements sont donc faibles, mais cohérents avec les résultats d'une expérience de culture en pot, menée par Lombi et al. (2001), de

*Thlaspi caerulescens* (écotype Ganges) sur sol contaminé en Cd et Zn (19 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 2920 mg Zn kg<sup>-1</sup>, soit 7 et 1.5 fois moins contaminé que le sédiment utilisé pour notre étude). Après une période de 391 jours de culture au cours de laquelle les parties aériennes des plantes ont été fauchées puis récoltées 3 fois, 8,3 mg de Cd et 200 mg de Zn ont été extraits par kg de sol. En comparaison, dans notre cas, *A. halleri* d'origine MET a extrait environ 1mg de Cd et 98 mg de Zn par kg de sédiment en 5 mois, soit 153j, sans opération de fauchage. Si on extrapole à 391 jours et qu'on émet l'hypothèse d'une extraction constante, *A. halleri* et *Thlaspi caerulescens* semblent extraire les mêmes quantités de Zn, par contre, *Thlaspi caerulescens* semble extraire plus de Cd que *A. halleri*. On peut également comparer nos résultats avec ceux obtenus lors d'expériences de phytoextraction en plein champ, en gardant à l'esprit que la culture en pot et en conditions contrôlées est plus favorable. Par exemple, en conditions naturelles de culture en champ, McGrath et al. (2006) ont montré que *Thlaspi caerulescens* cultivé pendant 14 mois sur un sol moyennement contaminé en Cd et Zn (*i.e.* entre 2.6 et 12.5 mg Cd kg<sup>-1</sup> et entre 107 et 365 mg Zn kg<sup>-1</sup>), a extrait 21,7 et 4.4 % respectivement, du Cd total et du Zn total contenu dans le sol. Les auteurs ont aussi montré que *A. halleri* accumulait des concentrations en Zn similaires à celles mesurées pour *Thlaspi caerulescens*, mais plus faibles en Cd.

En revanche, les taux d'extraction en Cd et Zn pour une plante non hyperaccumulatrice comme *Salix viminalis* par exemple, sont plus faibles que ceux mesurés pour *A. halleri*. En effet, Meers et al. (2005) enregistrent une extraction de 83g Cd ha<sup>-1</sup> et 5 kg Zn ha<sup>-1</sup> suite à la culture de *Salix viminalis* sur un sédiment de curage contaminé en Cd et Zn (entre 1.5 et 3.1 mg Cd kg<sup>-1</sup> et entre 500 et 950 mg Zn kg<sup>-1</sup>) ; ce qui correspond à une diminution annuelle de la teneur dans le sol de 0.02 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 1.4 mg Zn kg<sup>-1</sup>. King et al., (2006) rapportent qu'après 3 ans de culture de *Salix* spp. sur du sédiment contenant 20 mg Cd kg<sup>-1</sup> et 4285 mg Zn kg<sup>-1</sup>, 36 g Cd ha<sup>-1</sup> et 4.8 kg Zn ha<sup>-1</sup> ont été extraits.

Au vu des résultats de rendements d'extraction du Cd obtenus par l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices et par celle des plantes non hyperaccumulatrices développant de fortes biomasses, aucune de ces deux méthodes n'est encore satisfaisante. Afin de lever un certain nombre d'incertitudes sur ce qu'il se passe réellement dans le système « pot/plante » au cours de la culture, l'étude de la spéciation du Cd avant et après culture semble nécessaire.

## **II.3. CARACTERISATION DE LA SPECIATION ET LA LOCALISATION DU Cd DANS LE SEDIMENT APRES CULTURE**

### **II.3.1. Etude des spectres de composés modèles**

Une partie de l'analyse des données d'absorption X s'appuie sur la comparaison et l'ajustement par combinaison linéaire des spectres du sédiment à l'aide de spectres de composés modèles. Nous allons donc dans un premier temps présenter les bases de données de ces standards aux différents seuils (seuil K et L<sub>III</sub> de Cd et seuil K de S), décrire les structures locales de S et Cd dans les différentes formes chimiques, et la sensibilité de la spectroscopie XAS pour ces différentes formes.

#### **II.3.1.1. Spectres EXAFS au seuil K de Cd**

Les spectres de composés de référence au seuil K du Cd ont été regroupés en fonction de la nature du ligand et/ou du mode de fixation du Cd sur les figures II-21, II-22 et II-23. La liste complète des spectres, leur origine et les détails de la préparation des composés pour ceux qui ont été enregistrés au cours de cette thèse sont donnés dans l'annexe II-2.

La figure II-21 montre les spectres des composés inorganiques dans lesquels Cd est lié à des ligands oxygénés (ou à Cl pour CdCl<sub>2</sub>). Ces ligands sont des sulfates, phosphates, nitrates, carbonates, hydroxyles pour les minéraux, ou des hydroxyles pour les phases adsorbées (Cd adsorbée sur la goethite, la ferrihydrite, et la silice amorphe) et l'eau pour Cd<sup>2+</sup> en solution.

Tous les spectres enregistrés sont plus ou moins différents entre eux de par l'amplitude et la forme des oscillations (Fig. II-21). Cette observation est aussi vraie pour les spectres d'une même famille, par exemple, pour les oxydes de fer, qui présentent une signature spectrale caractéristique.



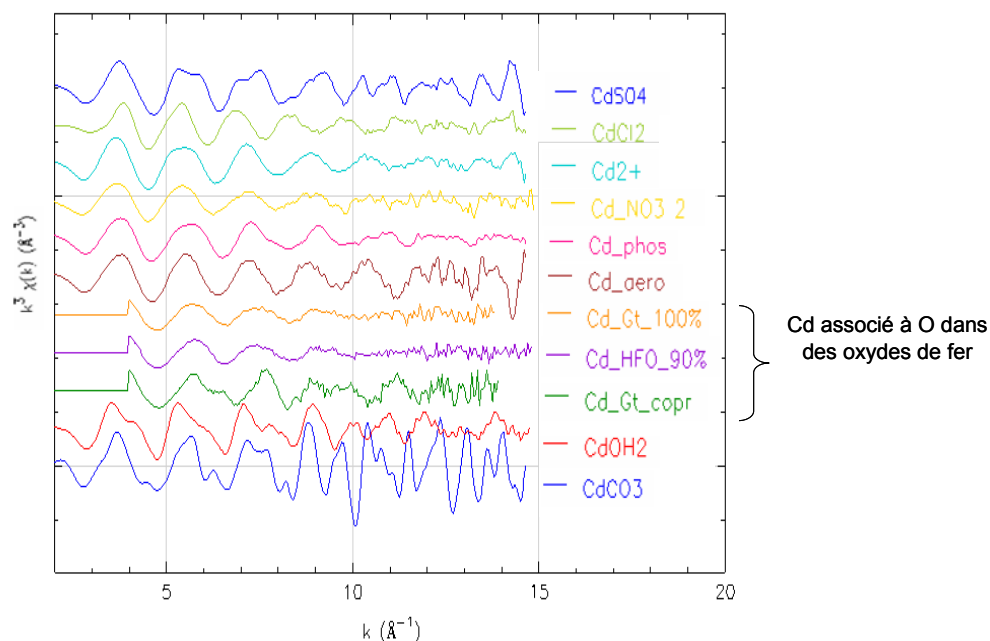


Figure II-21: Spectres EXAFS des composés de références enregistrés au seuil K du Cd où le Cd est sous la forme minérale excepté pour la référence Cd2+ où le Cd est sous forme dissoute. Le Cd est associé à des sulfates (CdSO4), des chlorures (CdCl2), des nitrates (Cd\_NO3\_2), des phosphates (Cd\_phos), de la silice amorphe (Cd\_aero, avec aero pour aérosil), des oxydes de fer (Cd\_Gt, Cd\_HFO, avec « Gt » pour la goetite et « HFO » pour la ferrhydrite – données issues de Spadini et al., 1994), des hydroxydes (CdOH2) et de la calcite (CdCO3). Le détail de la préparation des composés de référence est donné en annexe II-2

La figure II-22 montre les spectres des composés organiques dans lesquels Cd est lié à des ligands oxygénés (COOH/OH) ou azotés (NH<sub>2</sub>). Il s'agit de Cd complexé aux acides organiques suivants : l'acétate, l'oxalate, l'alginate, le malate, le citrate, le succinate, à un amino-acide, l'histidine et à la nicotianamine, un phytosidérophore. Nous avons aussi enregistré des spectres pour des composés de référence où le Cd est complexé à des polysaccharides présents dans les parois cellulaires comme Cd-pectine et Cd-cellulose. On observe que les signatures spectrales des complexes Cd-acides organiques sont très semblables, excepté pour Cd-oxalate, Cd-acetate et Cd-histidine pour lesquels les formes de la seconde et/ou quatrième oscillation sont différentes. En raison de leur forte ressemblance, nous avons regroupé en une seule et même famille les spectres « Cd associé à des acides organiques » (Cd-COOH/OH) dans les pourcentages d'espèces issues des combinaisons linéaires.

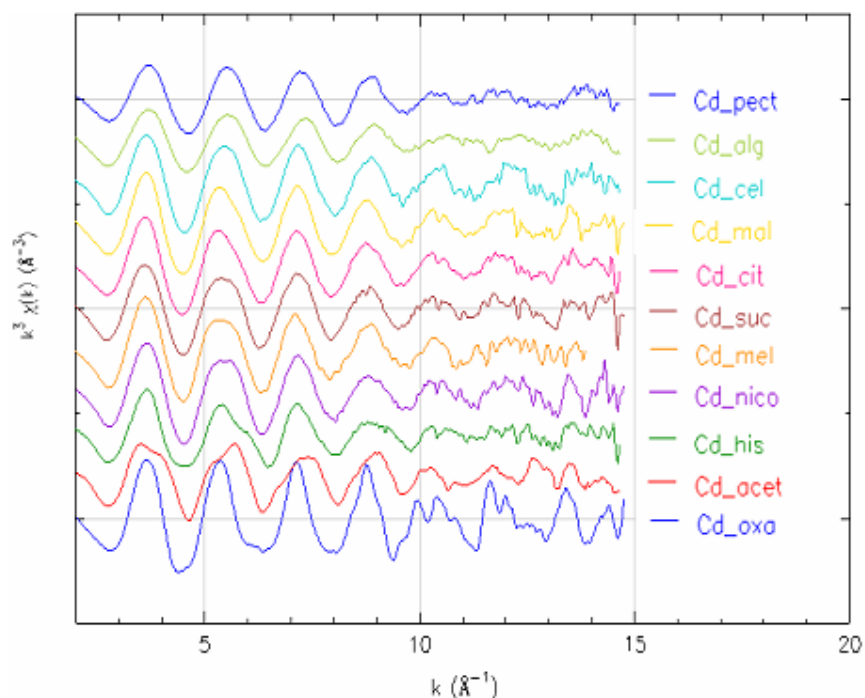


Figure II-22: Spectres EXAFS des composés de références enregistrés au seuil K du Cd où le Cd est associé à des composés organiques tels que la pectine (Cd\_pect), l'alginate (Cd\_olg), la cellulose (Cd\_cel), le malate (Cd\_mal), le citrate (Cd\_cit), le succinate (Cd\_suc), ou encore un mélange des trois derniers acides organiques cités (Cd\_mel), la nicotianamine (Cd\_nico), l'histidine (Cd\_his), l'acétate (Cd\_acet) et l'oxalate (Cd\_oxa).

La figure II-23 présente les spectres des composés de référence où le Cd est associé à du S (sauf pour CdSO<sub>4</sub>). Dans un premier temps, deux composés de référence présentant du Cd sous forme de sulfure minéral ont été analysés en EXAFS : un sulfure de cadmium (CdS : greenockite) et un sulfure mixte de zinc, cadmium et fer ((Zn,Cd,Fe)S). Ce dernier composé a été prélevé sur un échantillon de roche métamorphique provenant de Luchon (France), il a été caractérisé par DRX (spectre DRX en annexe II-6) et fluorescence X comme étant de la sphalérite enrichie en Cd et Fe. La teneur en Cd a été mesurée à environ 1350 mg kg<sup>-1</sup>.

Pour les composés contenant du Cd associé à du S réduit sous forme organique, le Cd est lié à des groupements thiols (R-SH) ; nos composés de référence sont Cd associé à de la cystéine, du glutathion (peptide glutamine-cystéine-glycine) et de la métallothionéine. Les spectres de ces 3 composés sont très semblables. De ce fait, ils sont regroupés sous le nom de « Cd-thiols ».

Pour terminer, la comparaison du spectre du  $\text{CdSO}_4$  (Cd lié à O, S en second voisin) avec ceux des Cd-thiols montre que la fréquence principale est plus basse et l'amplitude de la première oscillation plus importante dans le cas du ligand O (Fig. II-23).

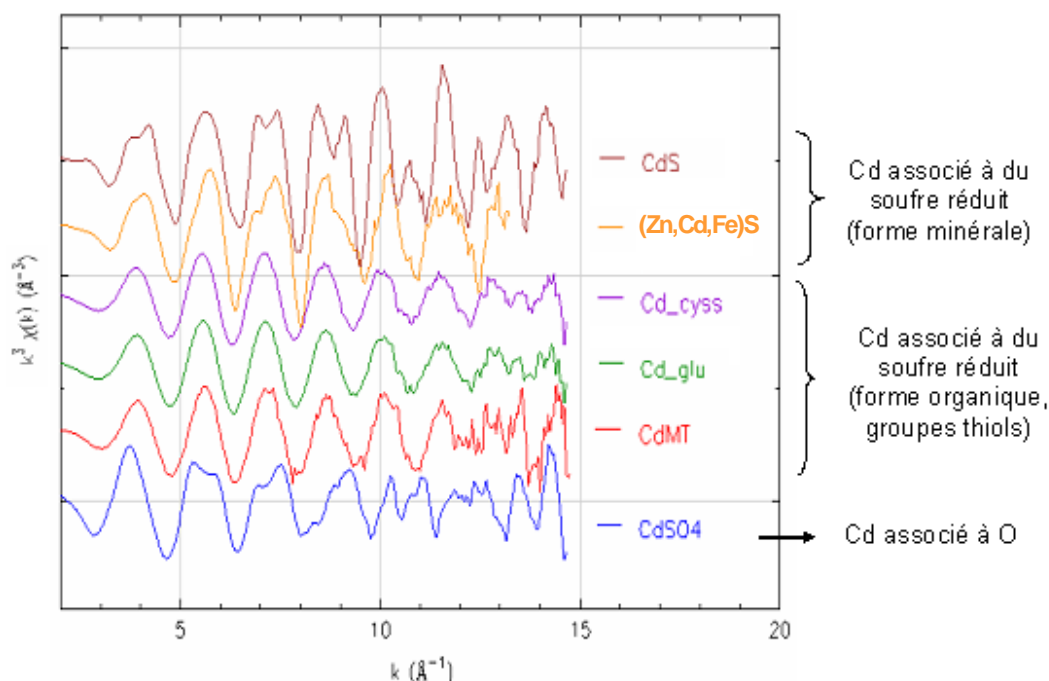


Figure II-23: Spectres EXAFS des composés de références au seuil K du Cd où le Cd est associé au S : sous forme minérale avec un sulfure de cadmium ( $\text{CdS}$  : greenockite) et un sulfure mixte ( $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$ ) ; et sous forme organique où le Cd est associé à des groupements « thiols » : Cd-cystéine ( $\text{Cd\_cyss}$ ), Cd-glutathion ( $\text{Cd\_glu}$ ) et Cd-métallothionéine ( $\text{CdMT}$ ). Le spectre du Cd associé à des sulfates ( $\text{CdSO}_4$ ) est présenté à titre de comparaison.

Afin de caler les paramètres de la simulation FEFF, les paramètres structuraux de certains composés de référence ( $\text{CdCO}_3$ , Cd-phosphate, Cd-alginate,  $\text{CdS}$  et  $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$ ) ont été déterminés (Fig. II-24 et tab. II-7). Pour  $\text{CdCO}_3$ , Cd-phosphate et  $\text{CdS}$ , les paramètres sont en très bon accord avec la structure cristallographique. Pour  $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$ , pour lequel on ne dispose pas de structure de référence, la première couche de coordination est simulée par 4 atomes de S, ce qui est cohérent avec la structure  $\text{CdS}$ , et la seconde couche par un mélange d'atome de Zn, Cd et Fe. Pour le complexe Cd-alginate, pour lequel on ne dispose pas non plus de structure, la première couche de coordination est simulée par 6 atomes d'oxygène. Ce nombre est cohérent avec les structures Cd-organiques connues (cf Cambridge Structural Database, Hideki et

al., 1976, Borodin et al., 1979, Orioli et al., 2002 ). En effet, pour les composés où le Cd est associé à des groupements carboxyles (COOH) ou alcool (OH) ou encore amines, la première couche contient généralement 6 à 8 voisins d'O/N. Pour un mélange de O et S, on compte plutôt entre 6 et 8 atomes voisins.

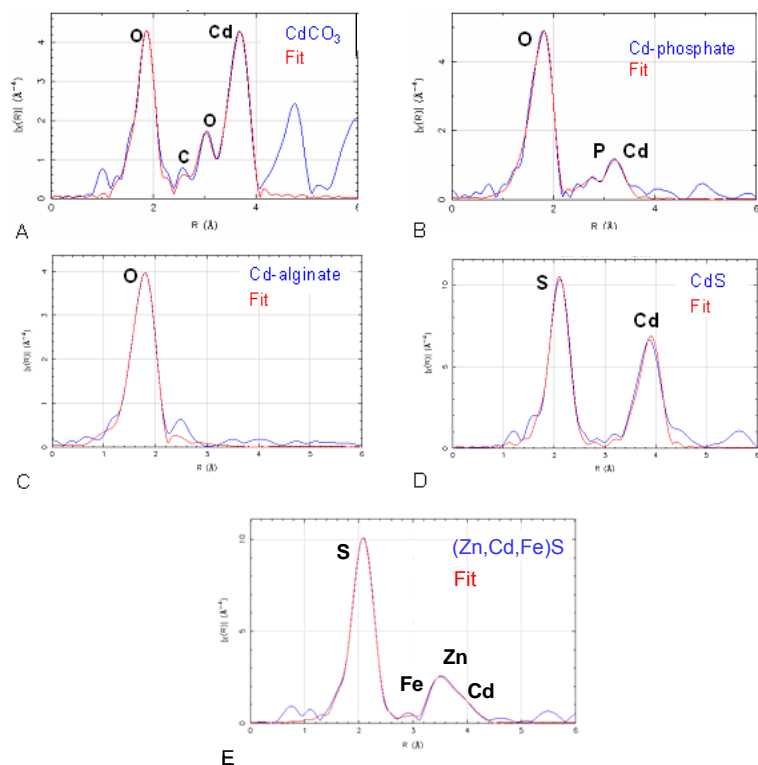


Figure II-24 : Spectres EXAFS expérimentaux (bleu) enregistrés au seuil K du Cd des composés références  $\text{CdCO}_3$  (A), Cd-phosphate (B), Cd-alginate (C), CdS (D) et (Zn, Cd, Fe)S (E) et les spectres obtenus par simulation FEFF (rouge).

Tableau II-7: Paramètres structuraux déterminés pour les composés de référence

Echantillon	k range	R range	atomes	N	R (Å)	$\sigma^2$	R factor	N théorique	R théorique
$\text{CdCO}_3$	[ 3.2 - 14.7 ]	[ 1.35 - 4.1 ]	O	6.2	2.28	0.0040	0.009	6	2.32
			C	6.1	3.18	0.0048		6	3.15
			O	5.8	3.40	0.0050		6	3.38
			Cd	6.0	3.93	0.0040		6	3.93
Cd-phosphate	[ 3.2 - 14.3 ]	[ 0.88 - 4.5 ]	O	6.1	2.27	0.0082	0.011	6	2.29
			P	2.9	3.44	0.0090		5	3.46
			Cd	1.7	3.50	0.0090		2.3	3.51
Cd-alginate	[ 3.2 - 12.7 ]	[ 1.01 - 3.6 ]	O	5.8	2.28	0.0093	0.015	-	-
CdS	[ 3.5 - 13.9 ]	[ 1.37 - 4.7 ]	S	4.0	2.52	0.0033	0.019	4	2.52
			Cd	10.4	4.14	0.0070		12	4.11
(Zn,Cd,Fe)S	[ 3.6 - 13.4 ]	[ 1.32 - 4.6 ]	S	4.0	2.52	0.0040	0.0022	-	-
			Fe	0.4	3.69	0.0090			
			Zn	5.0	3.89	0.0090			
			Cd	2.5	4.18	0.0090			

k range et R range représente les intervalles utilisés pour les simulations, N représente le

nombre d'atomes présents sur la première couche de coordination,  $R$  est la distance entre l'atome cible de Cd et les atomes de la première couche de coordination,  $\sigma^2$  est le facteur de Debye Waller et  $R$  factor est le résidu.  $N$  théorique et  $R$  théorique sont les données issues des structures déterminées par DRX utilisées pour la simulation (Szymanski, 1978, Hideki et al., 1976, Borodin et al., 1979, Orioli et al., 2002).

#### **II.3.1.2. Spectres XANES au seuil $L_{III}$ de Cd**

La figure II-25 présente les spectres de composés de référence représentatifs enregistrés en XANES au seuil  $L_{III}$  de Cd. La présence d'un pré-pic est caractéristique des ligands O, alors que l'absence de ce pré-pic signale des ligands S. Les spectre de CdS et de (Zn,Fe,Cd)S sont proches mais peuvent être distingués par la position et la forme des bosses vers 3550 et 3560 eV. Les spectres des références Cd-thiols ne comportent pas de bosses entre 3550 3560 eV. De la même façon que pour l'EXAFS, pour les CL, certains composés de référence de signature spectrale similaire ont été regroupées.

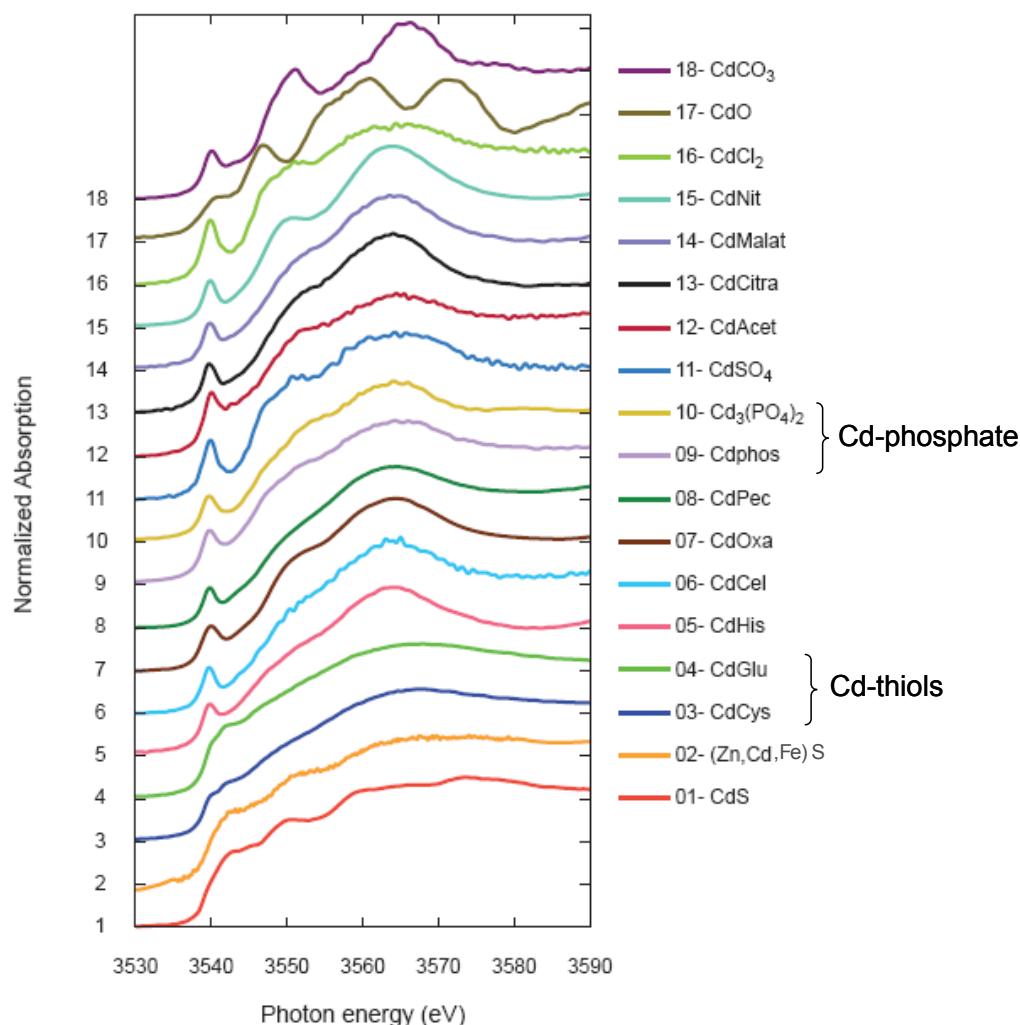


Figure II-25: Spectres XANES des composés de référence enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd. De haut en bas, les spectres ont été enregistrés sur des composés où le Cd est associé à de la calcite ( $CdCO_3$ ), à un oxyde ( $CdO$ ), à des chlorures ( $CdCl_2$ ), à des nitrates ( $CdNit$ ), à du malate ( $CdMalat$ ), à du citrate ( $CdCitra$ ), à de l'acétate ( $CdAcet$ ), à des sulfates ( $CdSO_4$ ), des phosphates ( $Cdphos$  et  $Cd_3PO_4$ ), à de la pectine ( $CdPec$ ), de l'oxalate ( $CdOxa$ ), de la cellulose ( $CdCel$ ), de l'histidine ( $CdHis$ ), du glutathion ( $CdGlu$ ), à de la cystéine ( $CdCys$ ) et des sulfures minéraux ( $CdS$  et  $(Zn,Cd,Fe)S$ ).

### II.3.1.3. Spectres XANES de S

La figure II-26 montre des composés de référence où le S présente des degrés d'oxydation différents, allant de +VI pour les sulfates au -II pour les sulfures. Les spectres de composés de référence ont été classés en plusieurs familles : les sulfures métalliques ( $CdS$ ,  $(Zn,Cd,Fe)S$ ,  $FeS_2$ ...), les sulfures organiques ( $R-SH$ ,  $R-S-R$ ,  $R-S-S-R$  et thiophènes), les sulfones, les sulfoxides, les acides sulfoniques et les sulfates.

Chaque famille comporte plusieurs composés de référence (catalogue en annexe II-2). Le XANES est une technique très sensible aux différents états d'oxydation du S et se traduit par un décalage du pic principal. Dans un souci de clarté, la figure II-27 présente un spectre par famille, excepté pour les sulfures métalliques. Pour illustration, le pic à 2473 eV est caractéristique des sulfures organiques, alors que le pic présent à 2482 eV est caractéristique des sulfates (Sarret et al., 1999 ; Foriel et al., 2004 ; Sandström et al., 2005).

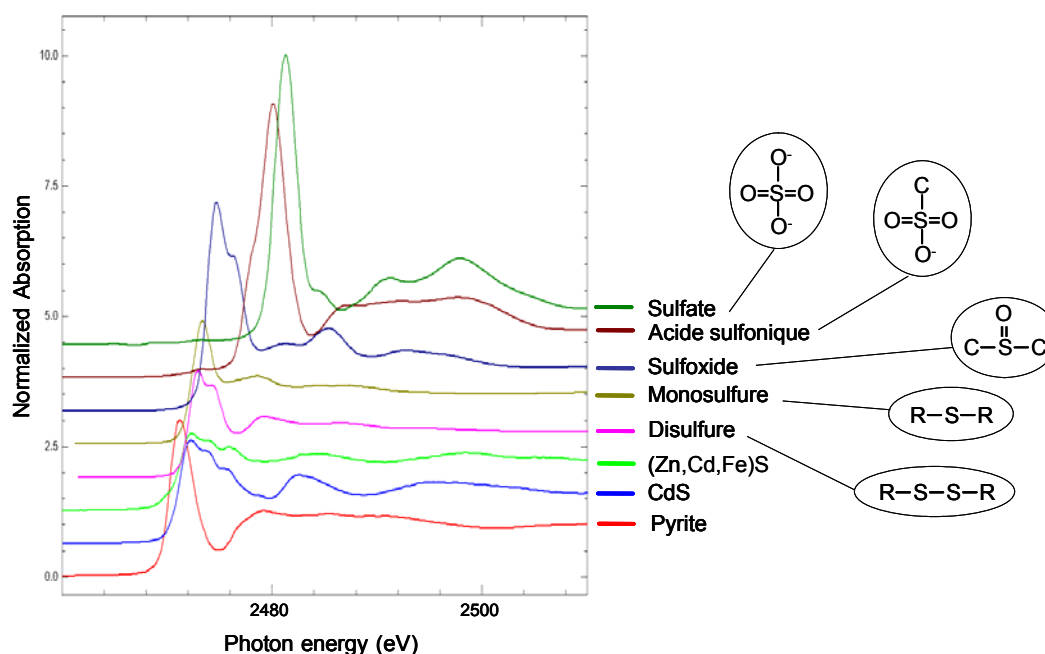


Figure II-26: Spectres XANES des composés de références enregistrés au seuil K du S.

### II.3.2. Spéciation du Cd dans le sédiment initial et le sédiment préparé avant culture.

#### II.3.2.1. Détermination de la spéciation moyenne de Cd

##### II.3.2.1.1. Spéciation de Cd dans le sédiment initial

Le spectre EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial sous forme de poudre pastillée est représenté sur la figure II-27. Dans un premier temps, ce spectre a été ajusté par combinaison linéaire des spectres de composés modèles (Fig. II-21,-22,-23). Le

meilleur ajustement par CL a été obtenue avec 100% de (Zn,Cd,Fe)S (Fig. II-27). L'ajout d'une seconde composante n'améliore pas significativement la qualité de l'ajustement (seulement 1% - Tab. A en annexe II-7).

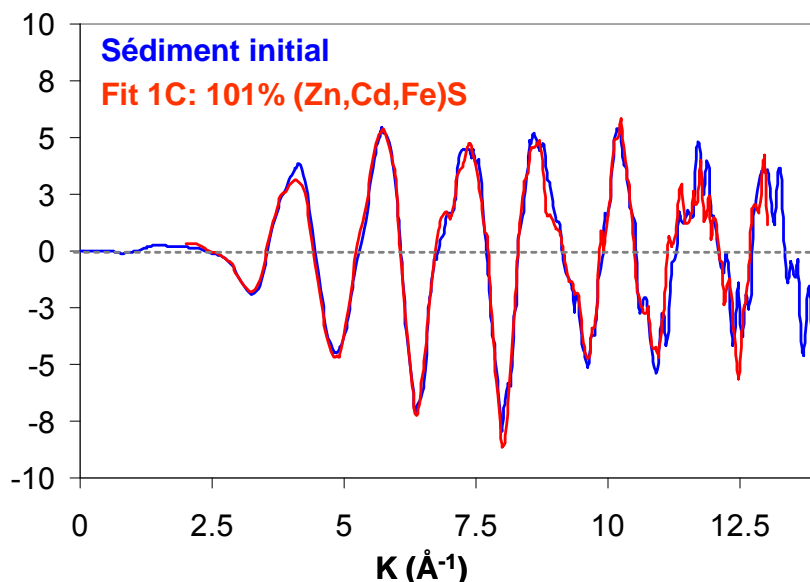


Figure II-27 : Spectre EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial, *i.e.* à la sortie du curage (bleu) et ajustement par combinaison linéaire à 1 composante (rouge).

Le spectre du sédiment initial a ensuite été traité par simulation FEFF. La première couche de coordination est correctement simulée par 3.9 atomes de S à 2.52 Å (Fig. II-28 et Tab. II-8). La seconde couche de coordination n'a pas été correctement simulée par des atomes de Cd (Fig. II-28A,-B). La simulation a été améliorée par l'ajout de Zn (Tab. II-8). Une amélioration supplémentaire a été obtenue avec un mélange d'atomes de Zn, de Cd et de Fe (Fig. II-28 et tab. II-8). Ceci suggère que le Cd est présent sous la forme d'un sulfure mixte de Zn, Cd et Fe (noté (Zn,Cd,Fe)S), comme attendu au vu de la CL (Fig. II-27). Les nombres de voisins Fe, Zn et Cd sont de 0.3, 4.8 et 2.2. On a donc un sulfure métallique contenant environ 2/3 de Zn, 1/3 de Cd et des traces de Fe. La somme des contributions des trois métaux donne 7.3 atomes. Ce nombre est inférieur aux 12 atomes de la structure CdS ou ZnS. Cette différence peut refléter un désordre structural important non pris en compte par le facteur de Debye Waller. Deux sources de désordre peuvent être proposées : La présence de plusieurs métaux dans le cristal, et le fait que Cd occupe probablement des sites cristallographiques non équivalents au sein du sulfure.



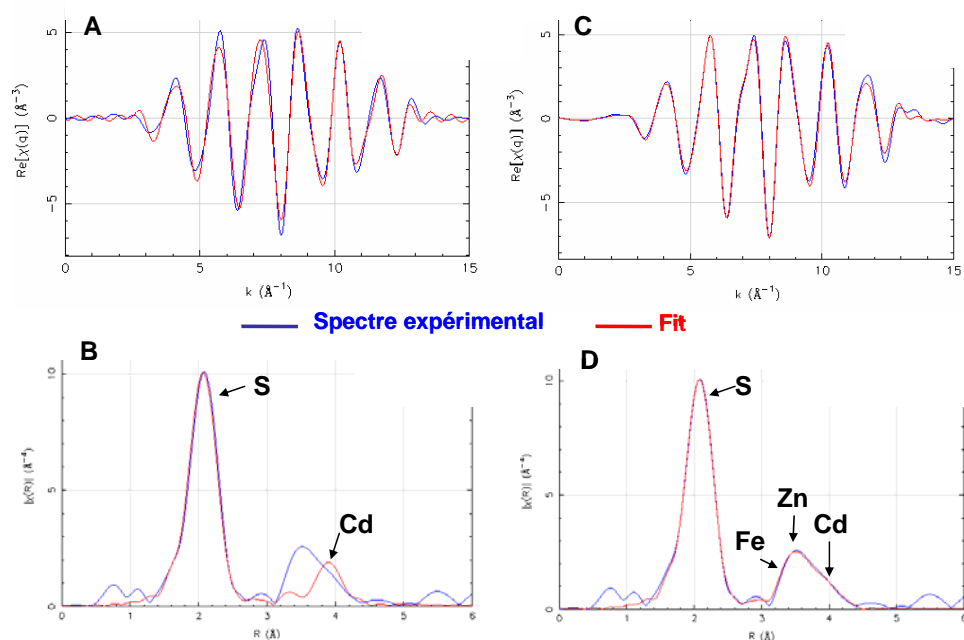


Figure II-28: (A, C) Spectres EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial (bleu) et spectres obtenus par simulation FEFF (rouge), et (B, D) les transformées de Fourier associées. (A, B) fit FEFF obtenu avec du S pour simuler la première couche de coordination et du Cd pour la seconde couche. (C, D) fit FEFF obtenu avec du S pour la première couche et du Zn, Fe et Cd pour la seconde couche.

Tableau II-8: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment initial

Echantillon	k range	R range	atomes	N	R ( $\text{\AA}$ )	$\sigma^2$	R factor
Sédiment initial simulation avec S, Zn, Fe, Cd	[ 3.6 - 13.4 ]	[ 1.35 - 4.3 ]	S	4.0	2.51	0.0037	0.0024
			Fe	0.3	3.69	0.0090	
			Zn	4.8	3.89	0.0090	
			Cd	2.2	4.17	0.0090	
Sédiment initial simulation avec S, Zn, Cd	[ 3.6 - 13.4 ]	[ 1.35 - 4.3 ]	S	4.2	2.51	0.0037	0.0037
			Zn	4.3	3.89	0.0070	
			Cd	3.1	4.17	0.0090	

#### II.3.2.1.2. Spéciation de Cd dans le sédiment préparé avant culture

Le spectre XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd du sédiment préparé est représenté sur la figure II-30. Ce spectre a été ajusté par combinaison linéaire des spectres de composés modèles (Fig. II-21,-22,-23). Le meilleur ajustement par CL a été obtenu avec 99% de (Zn,Cd,Fe)S (Fig. II-29). L'ajout d'une seconde composante n'améliore pas

significativement la qualité de l'ajustement. Le Cd présent dans le sédiment préparé est donc sous la forme d'un sulfure mixte. Bien que nous ne possédons pas encore le spectre EXAFS au seuil K de Cd du sédiment préparé (analyse prévue prochainement), ces résultats suggèrent que la spéciation de Cd identique dans le sédiment initial et préparé.

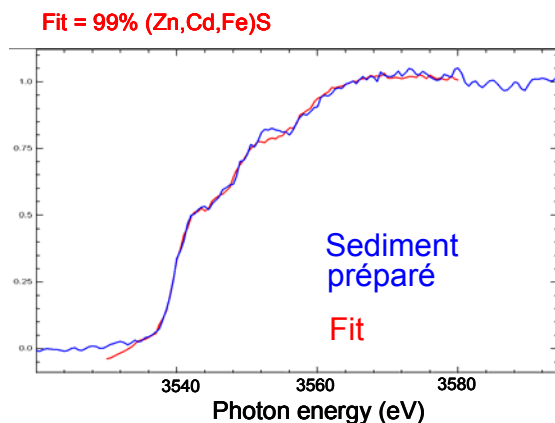


Figure II-29 : Spectres XANES enregistré au seuil  $L_{III}$  du Cd sur une pastille de sédiment préparé (bleu) (taille faisceau  $50\mu m \times 50\mu m$ ) et ajustement par combinaison linéaire à 1 composante (rouge).

#### II.3.2.1.3. Spéciation de Cd dans les différentes fractions granulométriques du sédiment initial

La figure II-30 présente les spectres EXAFS enregistrés pour chaque fraction granulométrique du sédiment préparé. Ils diffèrent par rapport au sédiment initial par la fréquence globale, la position de la première oscillation et l'amplitude et la forme des oscillations. Ceci suggère des différences de spéciation pour Cd.

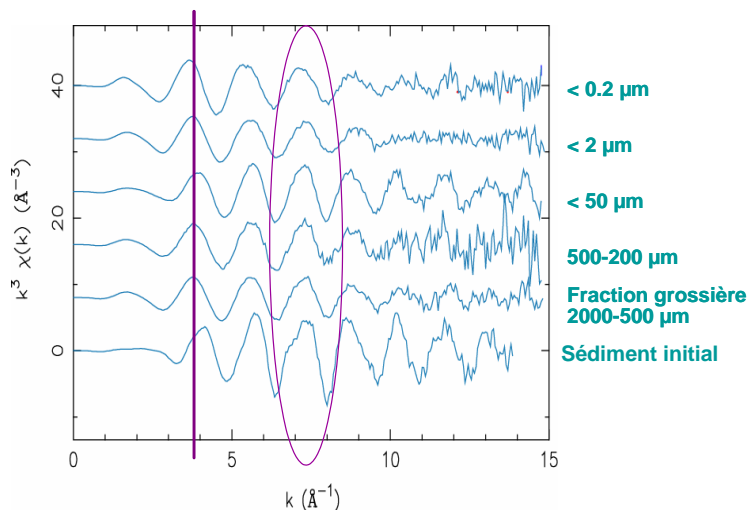


Figure II-30 : Spectres EXAFS au seuil K du Cd enregistrés sur les fractions granulométriques du sédiment préparé obtenues par tamisage sous eau, sédimentation dans une colonne d'eau (loi de Stokes) et centrifugation.

Les spectres enregistrés pour chaque fraction ont été traités par CL. Ils ont été reconstruits par des combinaisons de 1 à 4 composantes, comprenant le sulfure mixte  $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}^*$ , du Cd associé à des thiols, à des phosphates et à des acides organiques (tab. II-9). Dans les deux premières familles  $((\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$  et Cd-thiols), le cadmium est lié à du soufre réduit alors que dans les deux dernières il est lié à de l'oxygène (O de  $\text{PO}_4$  et O de  $\text{COOH/OH}$ , respectivement). Les proportions de ces espèces dans les différentes fractions sont relativement variables, avec une majorité de sulfures dans la fraction  $< 50 \mu\text{m}$ , et la totalité de Cd sous forme de Cd-organique dans la fraction  $< 0.2 \mu\text{m}$ . Si l'on combine les pourcentages obtenus à la distribution de Cd dans les fractions granulométriques du sédiment initial (cf section II.1.3, fig II-6), on conclue qu'au moins 20% du Cd devrait être sous forme de phosphate dans le sédiment total. Ceci est en désaccord avec la spéciation déterminée sur le sédiment avant culture (initial et préparé - 100% de  $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$ ). Ceci suggère une oxydation des sulfures lors du fractionnement granulométrique réalisé sous eau et la formation d'espèces secondaires.

---

\* La référence CdS apparaît dans certaines simulations, mais toujours de façon minoritaire par rapport à  $(\text{Zn,Cd,Fe})\text{S}$ . La forme sulfure est donc un sulfure mixte, qui peut être accompagnée de façon marginale par du CdS.

Tableau II-9 : Distribution des espèces de Cd déterminée par combinaison linéaire à partir des analyses globales du sédiment initial et des fractions granulométriques et du sédiment mis en suspension sous eau (MSE) (EXAFS seuil K) et du sédiment préparé (XANES seuil L<sub>III</sub>).

Noms des échantillons	Contribution (en %) des différents spectres de références pour simuler le spectre expérimental			
	(Zn,Cd,Fe)S *	Cd-thiols	Cd-phosphates	Cd-acides organiques
Sédiment initial	101**	-	-	-
Sédiment préparé (XANES)	99**	-	-	-
<u>Fractions granulométriques</u>				
fraction grossière (2000-500 µm)	25 ± 1	-	49 ± 11	22 ± 3
< 50 µm	42 ± 6	30 ± 6	25 ± 2	-
< 2 µm	11 ± 1	-	59 ± 5	15 ± 1
< 0.2 µm	-	-	-	100
Sédiment MSE	27 ± 3	-	29 ± 4	41 ± 7

Valeurs = moyenne ± écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les ajustements par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* contenant éventuellement une faible proportion de CdS.

\*\* Ajustement par CL réalisé avec une seule composante – valeur du meilleur ajustement obtenu.

Afin de vérifier l'impact du tamisage sous eau sur la spéciation du Cd, une aliquote de sédiment préparé a été mis en suspension (nommé sédiment MSE) dans de l'eau déionisée Milli-Q® et sous agitation pendant une nuit. Une fois séché et pastillé, le sédiment MSE a été analysé en EXAFS dans les mêmes conditions que les fractions. La figure II-31 compare la TF du spectre du sédiment MSE aux TF des spectres du sédiment initial, de (Zn,Cd,Fe)S et de la fraction grossière. On observe une forte similitude entre le premier et le dernier. Le spectre du sédiment MSE a été ajusté par un mélange de 27 ± 3 % de (Zn,Cd,Fe)S, 29 ± 4 % de Cd-phosphate et 41 ± 7 % de Cd-acides organiques (Tab. II-9). Le traitement par simulation FEFF du spectre du sédiment MSE confirme la présence de ligands soufrés et oxygénés, avec une première couche composée de 4.7 atomes d'O et de 2 atomes de S à des distances respectives de 2.36 Å et 2.48 Å (Tab. II-10). La seconde couche de coordination est simulée par un mélange d'atomes de C, Zn et Cd (Fig. II-32 et tab. II-10). L'ajout de Fe dans la 2<sup>nd</sup>e couche n'a pas permis d'améliorer la simulation (pas montrée).

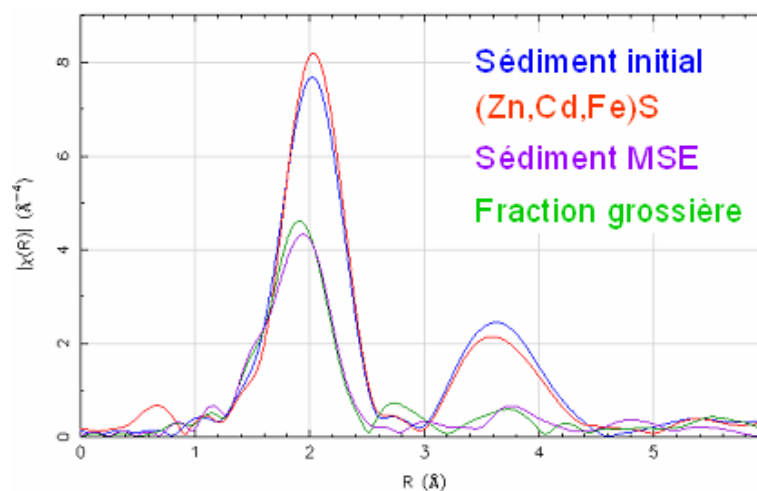


Figure II-31: Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés sur le sédiment initial (bleu), sur le composé de référence (Zn,Cd,Fe)S (rouge), sur le sédiment ayant subi les étapes d'humectation/dessiccation (violet) et sur la fraction grossière (vert).

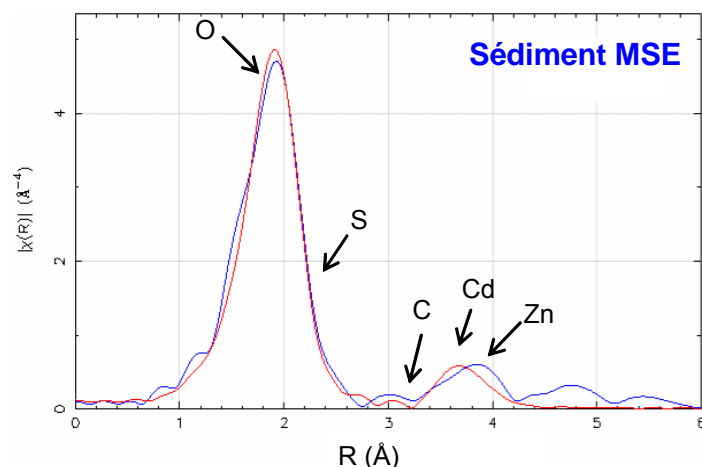


Figure II-32: Transformées de Fourier du spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment mis en suspension sous eau (MSE - bleu), et du meilleur spectre obtenu par simulation FEFF (rouge).

Tableau II-10 : Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment MSE

Echantillon	k range	R range	atomes	N	R (Å)	$\sigma^2$	R factor
Sédiment MSE, simulation avec O, S, C, Zn et Cd	[ 3.3 - 12.2 ]	[ 1.25 - 4.2 ]	O	4.7	2.36	0.0100	0.0164
			S	2.0	2.48	0.0100	
			C	1.3	3.27	0.0100	
			Cd	0.9	3.56	0.0130	
			Zn	2.6	3.96	0.0130	

Signification des paramètres : voir tableau II-8.

L'altération subie par le sédiment lors de l'opération de fractionnement granulométrique ou de la mise en suspension a donc fortement modifié la spéciation de Cd. Ces résultats suggèrent une sensibilité du sédiment à l'oxydation. De ce fait, les données EXAFS obtenues sur les fractions granulométriques ne sont pas exploitables. Il est intéressant de noter que le fractionnement granulométrique d'un sédiment similaire et réalisé selon le même mode opératoire, n'avait pas modifié la spéciation du Zn (Isaure, 2001 et Isaure et al., 2002). Les espèces du Cd semblent donc plus sensibles à l'oxydation que celles du Zn. L'analyse EXAFS des sédiments initial et préparé a pourtant montré une association intime de Cd, Zn et Fe sous forme de sulfure mixte, on aurait donc attendre un comportement similaire pour les deux métaux. Cependant, le Zn est 29 fois plus concentré que le Cd dans le sédiment. Une proportion mineure de Zn est donc présente sous forme de (Cd, Zn, Fe)S, l'essentiel étant probablement sous forme de ZnS.

#### **II.3.2.2. Détermination des espèces individuelles du Cd sur le sédiment préparé : micro-analyses.**

##### **II.3.2.2.1. Identification des phases porteuses**

Un repérage des zones riches en Cd et la détermination des associations géochimiques dans ces zones ont été réalisés par MEB-EDS sur les lames minces de sédiment préparé. Deux lames ont été observées, et une dizaine de spots contenant du Cd ont été recensés sur chaque lame. Les zones riches en Cd sont localisées en bordure de particules d'une taille des plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$ .

Sur l'ensemble des observations et analyses réalisées, une zone représentative est présentée ci-après sur la figure II-33. Sur cette figure, les grains en surbrillance visibles sur l'image MEB enregistrée en électrons rétrodiffusés contiennent une association de Cd, Fe, Zn et S. Le spectre EDS enregistré sur le spot 2 (Fig. II-34B,C) indique une composition chimique (en % atomique) de 39.9% de S, 31.6% de Zn, 12.0% de Si, 6.9% de Al, 3.1% de Mg, 1.8% de Cd, 1.8% de Ca, 1.8% de Na et 1.1% de Fe. Ces résultats suggèrent la présence d'un sulfure de Zn contenant des impuretés de Cd et Fe, et d'autres phases silico-alumineuses minoritaires. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus en EXAFS.

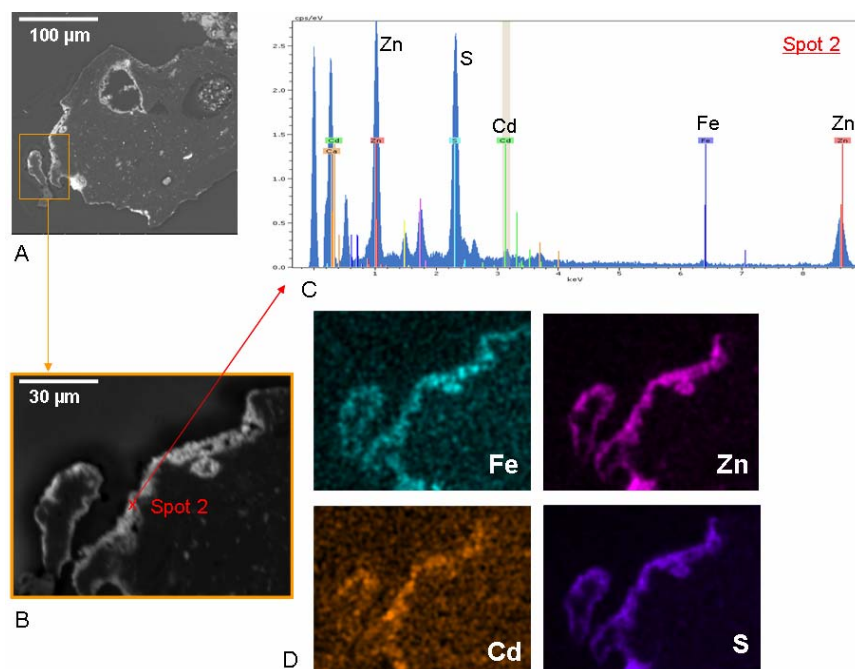


Figure II-33: (A, B) Images MEB en électrons rétrodiffusés et zoom de la zone étudiée, (C) Spectre EDS enregistré sur un spot riche en Cd sur la lame de sédiment préparé (spot 2), (D) Cartes élémentaires pour le Fe, Zn, Cd et S de cette région.

Des cartes de distributions élémentaires ont été enregistrées en  $\mu$ XRF sur la même zone en vue de l'analyse  $\mu$ XANES (Fig. II-34A). Dans nos conditions expérimentales, le MEB-EDS et la  $\mu$ XRF sont complémentaires puisque le MEB-EDS a fourni une information sur la distribution de Fe et Zn (alors que ces éléments n'ont pas été analysés sur LUCIA) et il présente une meilleure résolution spatiale que la  $\mu$ XRF, alors que cette dernière est plus sensible. Ainsi, la carte de répartition du Cd est de meilleure qualité et une carte de répartition du P a pu être obtenue. La figure II-34C montre une relativement bonne corrélation entre P et Cd d'une part ( $R^2 = 0.76$ ), et entre Cd et S d'autre part ( $R^2 = 0.78$ ). Deux spots de forte concentration en Cd ont été repérés. Les spots 1 et 2 contiennent les mêmes éléments mais en concentrations différentes. Au vu des intensités de fluorescence, le spot 2 est enrichi en Cd et appauvri en S et P par rapport au spot 1, comme le montre la comparaison des ratios des coups de fluorescence S/Cd et P/Cd (Fig. II-34A).

En raison de ces différences, ces deux spots ont été sélectionnés pour l'enregistrement de spectres  $\mu$ -XANES aux seuils  $L_{III}$  du Cd et K du S.

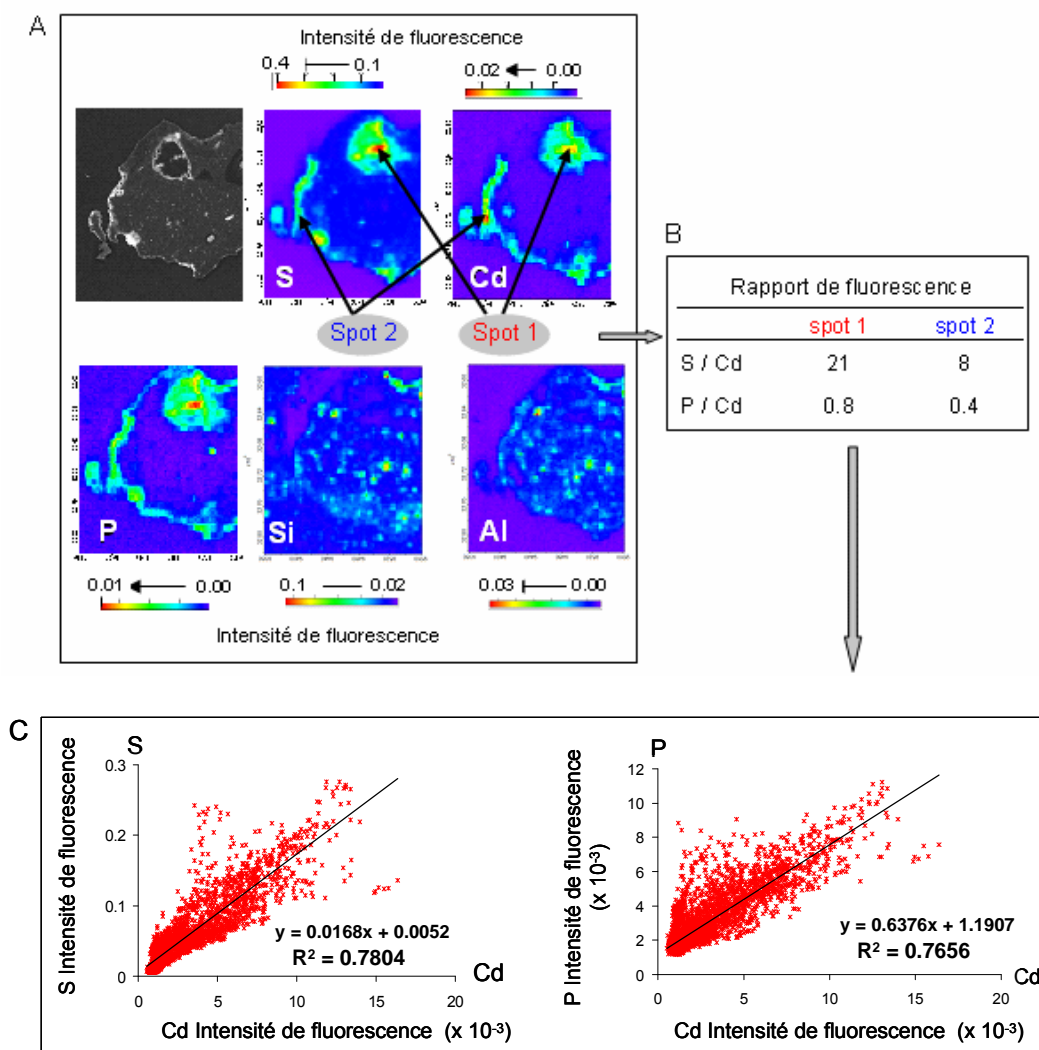


Figure II-34: (A) Images MEB en électrons rétrodiffusés et cartes de répartition de S, Cd, P, Si et Al obtenues sur un grain du sédiment préparé (lame mince) par  $\mu$ XRF (pas de 3  $\mu$ m, temps de comptage : 1s/pt). (B) rapport des intensités de fluorescence S/Cd et P/Cd pour les spots 1 et 2. (C) Diagrammes de corrélation S-Cd et P-Cd de la zone cartographiée.

#### II.3.2.2.2. Analyses $\mu$ XANES du Cd : spéciation du Cd présent dans les phases individuelles.

Les spectres  $\mu$ XANES au seuil  $L_{III}$  de Cd enregistrés sur les spots 1 et 2 sont similaires à ceux de CdS et (Zn,Cd,Fe)S issus de la même famille des sulfures sous forme minérale (Fig. II-35). La forme du seuil d'absorption et l'absence de pré-pic à 3540 eV suggèrent qu'il n'y a pas ou très peu de ligands oxygénés pour Cd. Ces spectres sont reconstruits avec 2 composantes, l'ajout d'une troisième composante n'améliorant pas



significativement la qualité de la simulation (Annexe II-7, tab. B). Le spectre du spot 1 est simulé par une combinaison de  $88 \pm 8 \%$  de (Zn,Cd,Fe)S et de  $18 \pm 8 \%$  de Cd-thiol (tab. II-11 - la moyenne réalisée sur les 5 meilleurs ajustements proposés par CL). En revanche, pour le spectre du spot 2 deux combinaisons de qualité équivalente ont été obtenus: 104 % de (Zn,Cd,Fe)S ou Cd-thiols (62%) et (Zn,Cd,Fe)S (48%) (Fig. II-36, tab. II-11). Aucune des deux ne reproduit de façon vraiment satisfaisante le spectre. Nous pensons que nous ne possédons pas la bonne référence de sulfure minéral. Malgré une relativement bonne corrélation entre Cd et P ( $R^2 = 0.76$ ), aucune association Cd-phosphate n'a été mise en évidence.

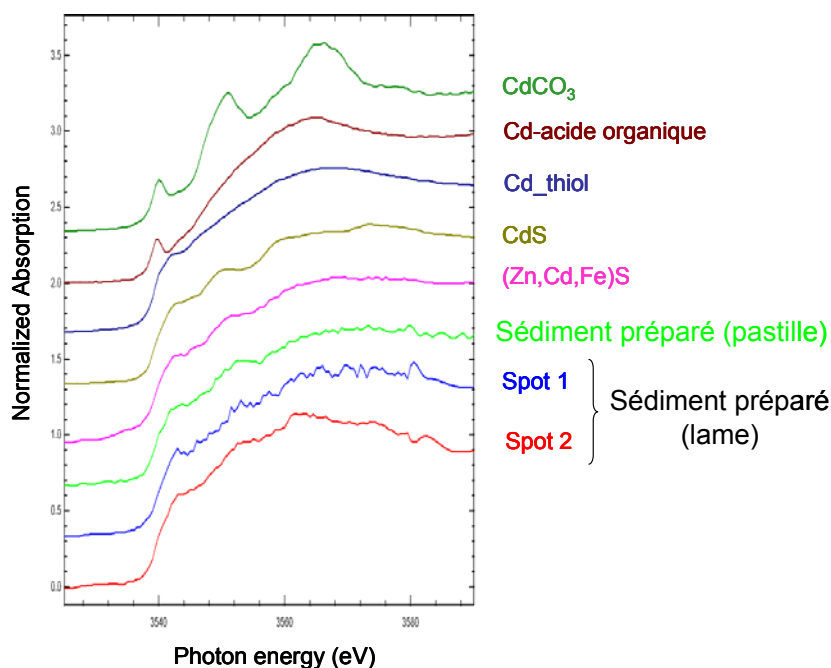


Figure II-35: Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé et spectres XANES sur le sédiment préparé et sur deux types de composés de référence présentant Cd associé à O ( $CdCO_3$ ) et Cd associé à du S sous forme réduite ( $CdS$ ,  $(Zn,Cd,Fe)S$ ).

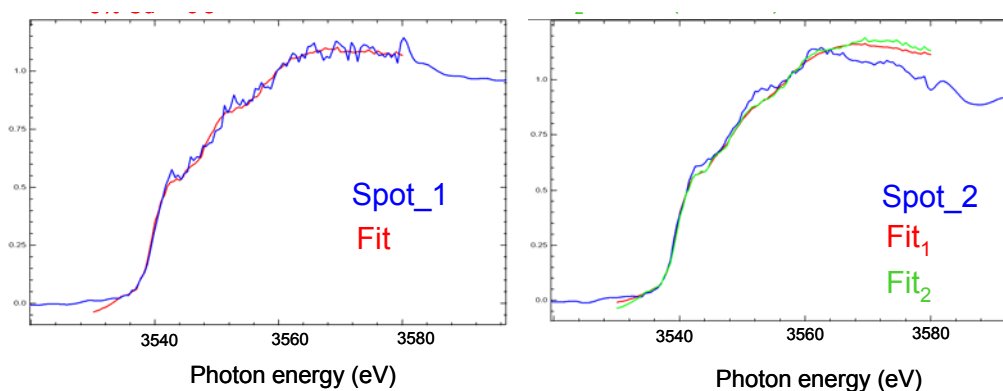


Figure II-36 : Simulation des spectre XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé (bleu) par combinaison linéaire à 2 composantes au maximum. Dans chaque cas, la meilleure simulation est représentée : Pour le spot 1, 82% (Zn,Cd,Fe)S + 15% Cd-thiol et pour le spot 2, 104% (Zn, Cd, Fe)S.

Tableau II-11 : Distribution des espèces de Cd déterminée par combinaisons linéaires des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment préparé (spot 1 et spot 2).

Noms des échantillons	Contribution (en %) des différents spectres de		
	(Zn,Cd,Fe)S	Cd-thiols	autres
spot 1	88 ± 8	18 ± 8	-
spot 2	48	62	-
(2 ajustements possibles)	104	-	10 (CdO)

Valeurs = moyenne ± écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les ajustements par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* Ajustement par CL réalisé avec une seule composante – valeur du meilleur ajustement obtenu.

#### II.3.2.2.3. Analyses $\mu$ XANES du S : spéciation du S présent dans les phases individuelles.

La figure II-37 compare les spectres  $\mu$ XANES au seuil K du S enregistrés sur le spot 1 et le spot 2 à des spectres de référence. Le spectre du spot 2 (zone plus riche en Cd) est proche du spectre de (Zn,Cd,Fe)S. Il a été simulé par une combinaison de  $71 \pm 6$  % de sulfures minéraux, de  $22 \pm 6$  % de sulfures organiques et de  $5 \pm 1$  % de sulfoxydes. La position du seuil de spectre du spot 1 suggère un mélange de sulfures et le pic à 2482 eV suggère la présence de S oxydé. Le spectre a été simulé par une combinaison de  $47 \pm 6$  % de sulfures minéraux, de  $25 \pm 7$  % de sulfures organiques et de  $10 \pm 3$  % d'acides

sulfoniques et/ou sulfates ; tab II-12 et fig. II-38 – annexe 7, Tab. C). Dans les deux cas, le soufre est majoritairement sous forme réduite, et plus le ratio S/Cd est grand, plus la proportion de S oxydé est importante.

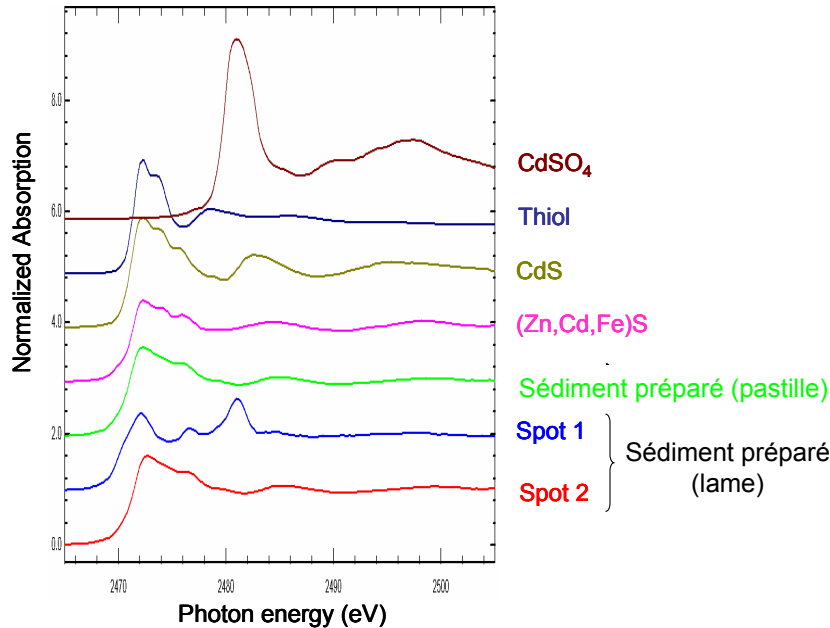


Figure II-37 : Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur le sédiment préparé (échantillon sous forme de pastille) et sur les spots 1 et 2 enrichis en Cd présent sur les lames de sédiment préparé et sur deux types de composés de référence : un sulfate ( $\text{CdSO}_4$ ) et deux sulfures minéraux ( $\text{CdS}$  et  $(\text{Zn}, \text{Cd}, \text{Fe})\text{S}$ ).

Tableau II-12: Distribution des espèces de S déterminée par combinaison linéaire pour le sédiment préparé et pour des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment préparé (spot 1 et spot 2).

Noms des échantillons	Contribution (en %) des différents spectres de références pour simuler le spectre expérimental		
	Sulfures sous forme minérale	Sulfures organiques	S sous forme oxydée
Sédiment préparé (signal global)	$89 \pm 2$	-	$9 \pm 2^*$
Spot 1	$53 \pm 3$	$36 \pm 3$	$5 \pm 1^{**}$
Spot 2	$71 \pm 6$	$22 \pm 6$	$5 \pm 1^{**}$

Valeurs = moyenne  $\pm$  écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les simulations par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* acides sulfoniques ou sulfates

\*\* sulfoxydes

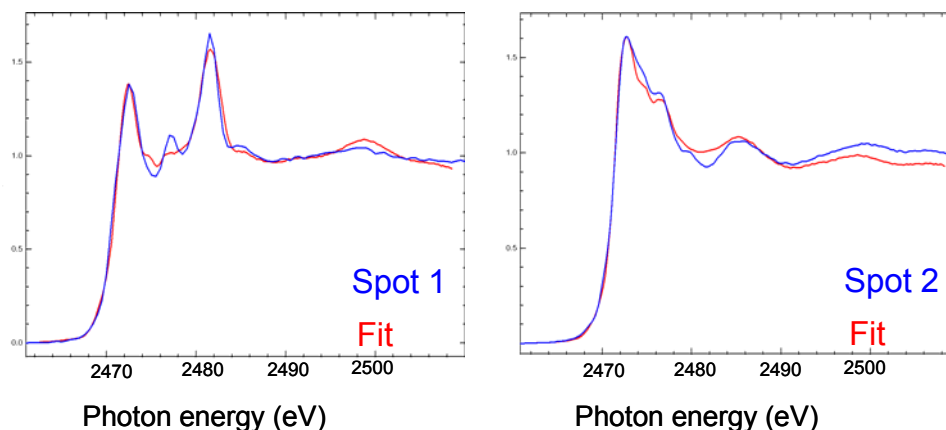


Figure II-38 : Spectres XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots 1 et 2 du sédiment préparé (bleu) et meilleures simulations obtenues par combinaison linéaire à 4 composantes (rouge).

### II.3.2.3. Spéciation dans le sédiment initial avant culture : bilan

Les résultats des analyses globales réalisées en EXAFS au seuil K du Cd sur le sédiment initial, à la sortie du curage, montrent que le Cd est principalement présent sous forme d'un sulfure mixte de Zn, Cd et Fe et que cette espèce est très sensible à l'oxydation liée à une mise en suspension suivie d'un séchage. Les résultats des analyses globales réalisées en XANES au seuil L<sub>III</sub> du Cd sur le sédiment préparé pour la culture montrent aussi que le Cd est principalement présent sous forme d'un sulfure mixte de Zn, Cd et Fe. Toutes les étapes de préparation du sédiment initial (le séchage pendant 7 mois et les manœuvres d'homogénéisation) effectuées avant le transfert des plantes ne semblent pas changer la spéciation du Cd dans le sédiment. Avant culture de *A. halleri*, le Cd est présent sous la forme réduite dans le sédiment. En revanche, la mise en solution sous agitation pendant 12h et le fractionnement granulométrique sous eau ont modifié la spéciation de Cd.

Les résultats des microanalyses et  $\mu$ XANES réalisées au seuil L<sub>III</sub> du Cd confirment que les espèces individuelles de Cd observées sur les différentes lames de sédiment préparé sont des sulfures principalement minéraux mais aussi dans une moindre mesure organiques, et n'ont pas mis en évidence de ligands oxygénés du Cd. Les microanalyses réalisées au seuil K du S sur les mêmes zones montrent que le S est majoritairement présent sous forme réduite, et l'analyse globale montre qu'environ 10% du soufre présent dans le sédiment initial est oxydé.

### II.3.3. Spéciation du sédiment après culture

#### II.3.3.1. Détermination de l'espèce moyenne du Cd présent dans le sédiment après culture

Afin d'étudier l'impact d'*A. halleri* sur la spéciation du Cd dans le sédiment, nous avons comparé le sédiment préparé avant et après culture ainsi que le sédiment contenu dans le pot témoin non végétalisé.

Dans un premier temps, les spectres enregistrés après culture (à  $t_5$ ) par *A. halleri* des 2 origines, et sur le sédiment du pot témoin non végétalisé (à  $t_6$ ) ont été comparés au sédiment initial, i.e. le sédiment avant culture, mais aussi au sédiment MSE (mis en suspension dans l'eau) (Fig. II-39). Les spectres après culture par *A. halleri* des deux origines et celui du pot témoin sont assez ressemblants, bien que le spectre pour le sédiment témoin présente des oscillations d'amplitude légèrement plus faibles, en particulier celle à  $11\text{\AA}^{-1}$  (Fig. II-39). De plus, l'observation des TF de ces 3 spectres montre que le pic correspondant à la première couche de coordination est plus large sur sa partie droite pour le sédiment seul, ce qui suggère la présence d'une contribution à plus grande distance (Fig. II-40). Ces spectres sont proches de celui du sédiment MSE, tout au moins pour les 4 premières oscillations. Cette dernière observation suggère une oxydation des sulfures métalliques, comme observé dans le sédiment MSE. En revanche, ces spectres se distinguent clairement de ceux enregistrés pour le sédiment initial par des décalages en fréquence et des amplitudes nettement plus faibles (Fig. II-39).

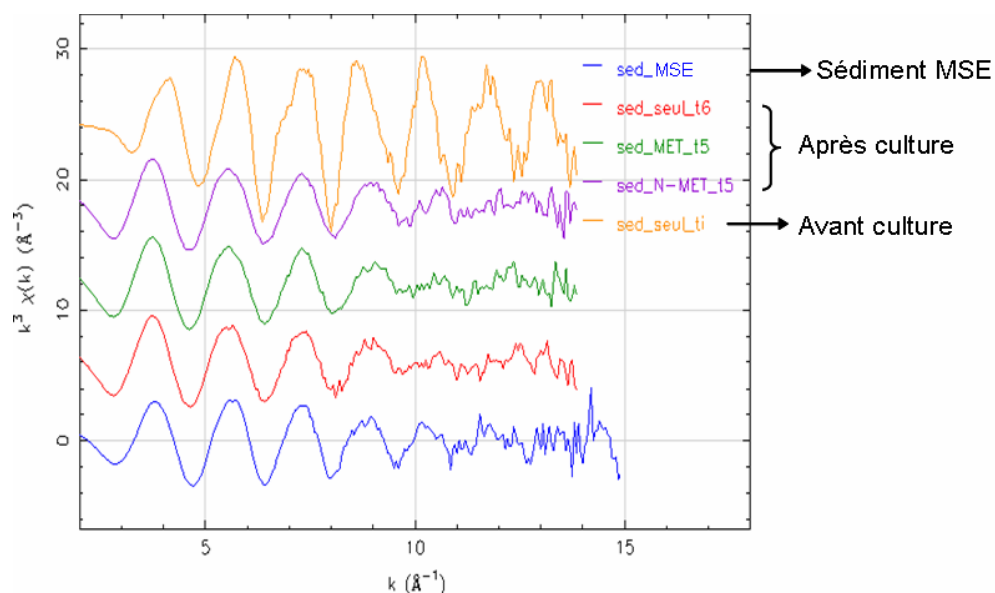


Figure II-39 : Spectres EXAFS au seuil K du Cd du sédiment initial (jaune), et du sédiment après 5 mois de culture par *A. halleri* d'origine MET (vert) et d'origine N-MET (violet). Les spectres du pot témoin non végétalisé à *t6* (rouge) et du sédiment mis en suspension dans l'eau (MSE - bleu) sont aussi représentés.

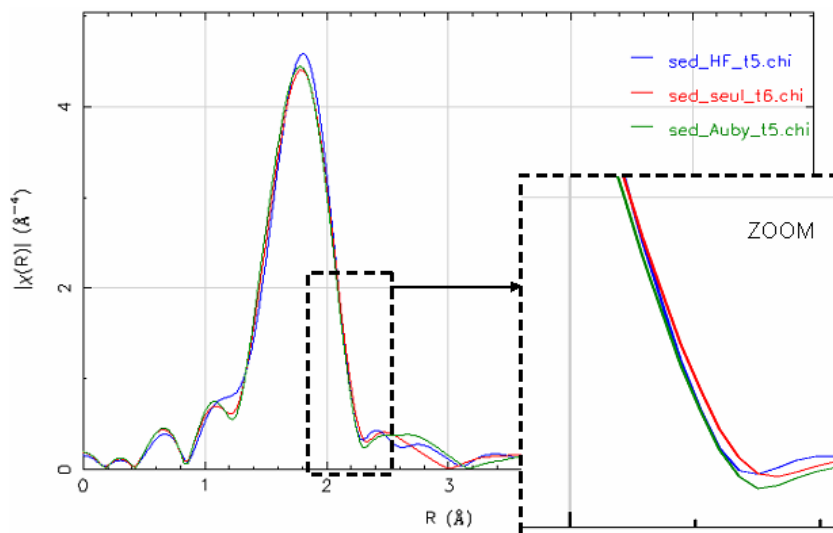


Figure II-40 : Superpositions des TF des spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment des pots végétalisés par *A. halleri* (d'origine MET en vert et N-MET en bleu) et du pot témoin (rouge). Zoom du pied du premier pic des TF.

Les spectres ont été traités par combinaison linéaire avec 4 composantes au maximum (Annexe II-7, tab. D). Les résultats de simulation sont présentés dans le tableau II-13 et figure II-41.

Les spectres des sédiments végétalisés sont reconstruits par un mélange de Cd-acides organiques ( $64 \pm 5$  % pour MET et  $61 \pm 16$  % pour N-MET, tab. II-13) et de Cd-phosphates ( $34 \pm 2$  % pour MET et  $30 \pm 16$  % pour N-MET, tab. II-13). Il n'y a donc pas de différence significative entre les deux origines. Aucune contribution de sulfures de Cd n'est détectée. Ces résultats indiquent un changement majeur de spéciation du Cd dans les pots végétalisés, avec oxydation totale des sulfures et redistribution de Cd sur des composés organiques et des phosphates.

Le spectre du pot témoin est reconstruit par un mélange de  $74 \pm 2$  % de Cd-acides organiques,  $22 \pm 1$  % de Cd-phosphates et  $8 \pm 1$  % des Cd-thiols (tab. II-13). Cette dernière composante n'apparaît pas dans les simulations du sédiment végétalisé. Cela est cohérent avec la différence de largeur de la base du premier pic observée sur la TF du spectre (Fig. II-40). Etant donné le faible pourcentage que représente cette composante (8%), nous avons voulu tester sa significativité. Nous avons effectué des CL en excluant les références Cd-sulfures organiques. Pour une simulation à 4 composantes, le coefficient d'efficacité augmente de 10,6 % sans ces références, ce qui peut être considéré comme significatif. On observe aussi que les proportions de Cd-phosphate et Cd-acides organiques sont légèrement différentes entre sédiment seul et végétalisé.

Les différences de spéciation du Cd observées entre le sédiment avant culture, le sédiment témoin et les sédiments végétalisés suggèrent qu'il y a d'une part un effet inhérent aux conditions de culture (durée de la culture, apport en eau, lixiviation mensuelle, phases de séchage entre les arrosages, ou autres phénomènes biologiques agissant dans le pot...) et d'autre part un effet de la plante, qui semble beaucoup moins important.

Tableau II-13 : Spéciation du Cd simulée par combinaison linéaire des spectres EXAFS au seuil K du Cd pour le sédiment initial, le sédiment mis en suspension dans l'eau (MSE), le sédiment après 5 mois de culture par *A. halleri* d'origine MET et N-MET et le sédiment du pot témoin non végétalisé à *t6*. Les combinaisons linéaires ont été simulées avec 4 composantes au maximum.

Noms des échantillons	Contribution (en %) des différents spectres de références pour simuler le spectre expérimental			
	(Zn,Cd,Fe)S *	Cd-thiols	Cd-phosphates	Cd-acides organiques
<u>avant culture</u>				
Sédiment initial	101**	-	-	-
Sédiment MSE	27 ± 3	-	29 ± 4	41 ± 7
<u>après culture</u>				
Sédiment seul à <i>t6</i>	-	8 ± 1	22 ± 1	74 ± 2
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine MET à <i>t5</i>	-	-	34 ± 2	64 ± 5
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine N-MET à <i>t5</i>	-	-	30 ± 16	61 ± 16

Valeurs = moyenne ± écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les simulations par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* contenant éventuellement une faible proportion de CdS

\*\* Ajustement par CL réalisé avec une seule composante – valeur du meilleur ajustement obtenu.

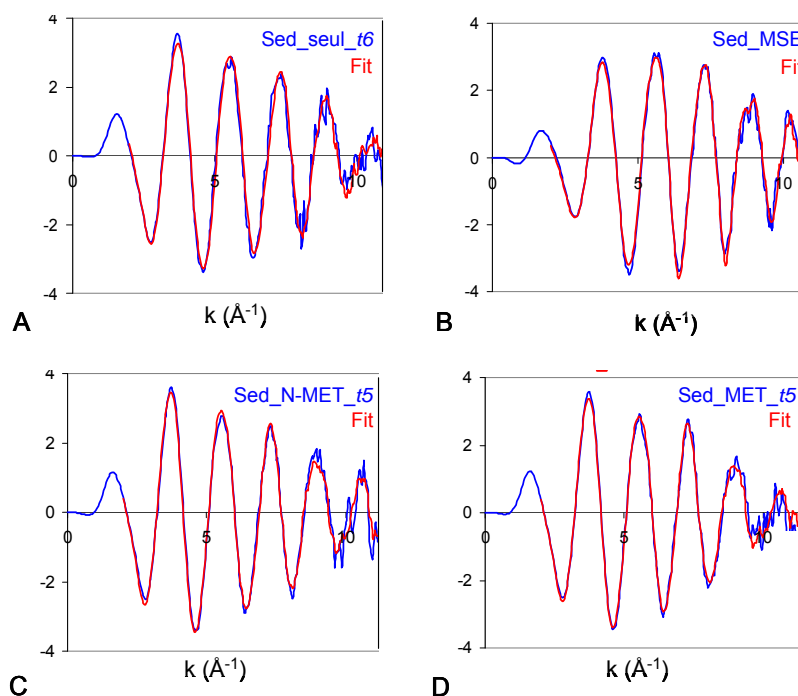


Figure II-41 : Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment du pot témoin à *t6* (A), des pots végétalisés par *A. halleri* à *t5* (C et D) et du sédiment mis en suspension dans l'eau (MSE - B), ainsi que le spectre de la meilleure simulation obtenue (fit rouge). AO signifie Acide Organique.



### II.3.3.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : simulation numérique.

La figure II-42 montre les transformées de Fourier (TF) des différents spectres. Comme vu précédemment, la TF du sédiment initial présente un premier pic intense vers 2.1 Å attribué à des atomes de S et un deuxième pic relativement large vers 3.5 Å attribué à Fe, Zn et Cd. Les TF des sédiments après culture ont un premier pic à une distance plus faible (1.8 Å) et moins intense que le pic caractéristique du S, et des contributions des couches supérieures de très faible amplitude. Rappelons que la base du premier pic de la TF du spectre du sédiment témoin est plus large que celles des spectres du sédiment végétalisé (Fig. II-42). La TF du sédiment MSE se distingue des précédents par un premier pic à une distance légèrement supérieure (1.9 Å). Rappelons que ce pic a été simulé par 4.7 atomes d'O et 2 atomes de S.

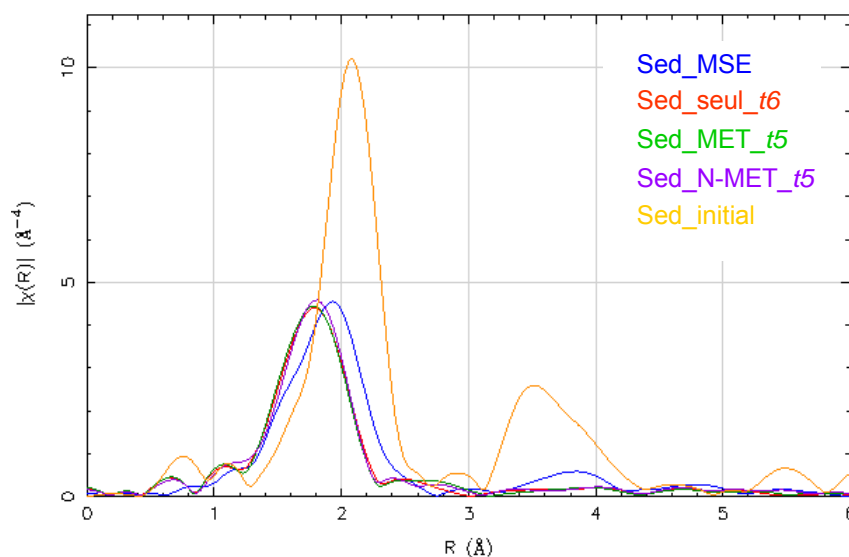


Figure II-42 : Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés sur le sédiment initial (jaune), sur le sédiment après 5 mois de culture par *A. halleri* d'origine MET (vert) et d'origine N-MET (violet), sur le sédiment du pot témoin non végétalisé à *t*6 (rouge) et sur le sédiment MSE (bleu).

Les résultats des simulations numériques pour les sédiments avant et après culture végétalisés ou non, et pour le sédiment MSE sont présentés sur les figures II-28, -32 et -43 et les paramètres structuraux sont compilés dans le tableau II-14.

Comme illustré par les TF, l'environnement structural du Cd dans le sédiment après culture, végétalisé ou non, sont très différents de ceux trouvés pour le sédiment avant culture (sédiment initial - tab. II-13). Tout d'abord, pour tous les spectres de sédiment après culture, la première couche de coordination du Cd est principalement composée d'atomes d'O (environ 6 atomes d'O à 2.29-2.30 Å - tab. II-14) alors que celle pour le sédiment initial est exclusivement composée d'atomes de S (4 atomes de S à 2.52 - tab. II-14). La seconde couche de coordination est de très faible amplitude et n'a donc pas été simulée.

Le sédiment MSE (sédiment initial mis en suspension dans de l'eau pendant 12h) présente un environnement structural intermédiaire avec un mélange d'atomes d'O et de S sur sa première couche de coordination et un mélange de C, Zn et Cd sur la seconde (Tab. II-14). Ce traitement induit un changement de spéciation en oxydant les phases contenant du Cd.

Parmi les sédiments étudiés après culture, l'environnement structural du Cd est légèrement différent dans le sédiment témoin et le sédiment végétalisé. En effet, la première couche de coordination est exclusivement composée d'environ 6 atomes d'O pour les sédiments végétalisés alors qu'on observe une faible contribution d'atome de S en plus de la contribution des atomes d'O (5.5 atomes d'O pour 0.6 atome de S – tab. II-14). Cette faible contribution de S dans un environnement structural majoritairement oxydé est cohérente avec la faible contribution en Cd-thiols déterminée par CL (*i.e.* environ 8% - paragraphe précédent).

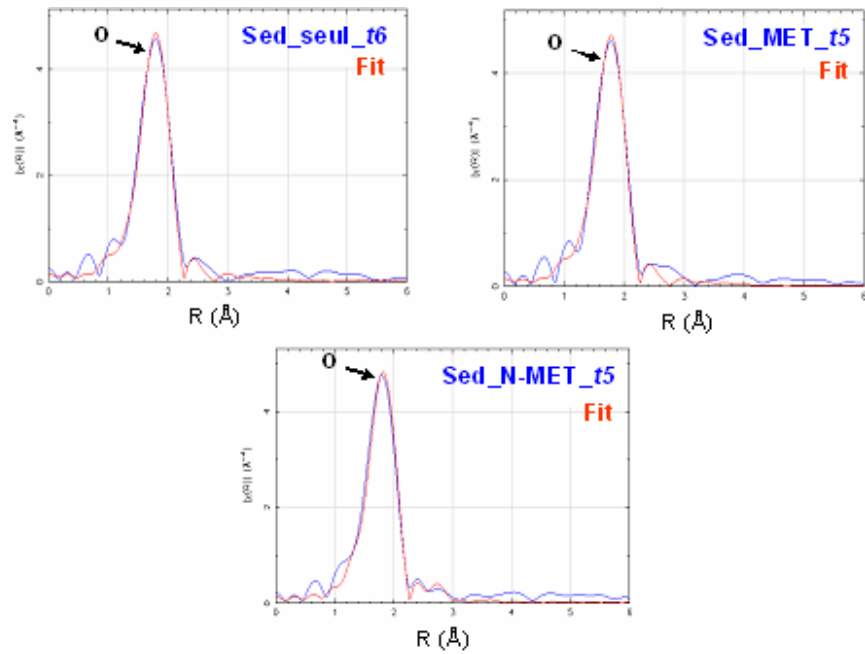


Figure II-43 : Transformées de Fourier du spectre EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur le sédiment des pots végétalisés par *A. halleri* et du pot témoin (bleu), et simulations FEFF (rouge).

Tableau II-14: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour le sédiment initial (jaune) et le sédiment MSE (bleu), le sédiment après 5 mois de culture par *A. halleri* d'origine MET (vert) et d'origine N-MET (violet) et le sédiment du pot témoin non végétalisé à t6 (rouge).

Echantillon	k range	R range	atomes	N	R (Å)	$\sigma^2$	R factor
Sédiment initial	[ 3.6 - 13.4 ]	[ 1.35 - 4.3 ]	S	3.9	2.51	0.0037	0.0024
			Fe	1.4	3.69	0.0090	
			Zn	7.2	3.89	0.0090	
			Cd	2.6	4.17	0.0090	
Sédiment seul à t6	[ 3.2 - 10.8 ]	[ 1.2 - 2.9 ]	O	5.5	2.29	0.0010	0.0026
			S	0.6	2.47	0.0010	
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine MET à t5	[ 3.2 - 10.8 ]	[ 1.2 - 2.3 ]	O	6.7	2.29	0.0097	0.0039
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine N-MET à t5	[ 3.2 - 10.8 ]	[ 1.2 - 2.3 ]	O	6.2	2.30	0.0086	0.0057
Sédiment MSE	[ 3.3 - 12.2 ]	[ 1.25 - 4.2 ]	O	4.7	2.36	0.0100	0.0164
			S	2.0	2.48	0.0100	
			C	1.3	3.27	0.0100	
			Cd	0.9	3.56	0.0130	
			Zn	2.6	3.96	0.0130	

### **II.3.3.3. Identification des phases porteuses individuelles de Cd présent dans le sédiment après culture : Analyses SEM-EDS, $\mu$ XRF et $\mu$ XANES**

#### **II.3.3.3.1. Repérage des espèces individuelles de Cd et mise en évidence des associations géochimiques en présence**

De la même façon que pour l'étude des espèces individuelles de Cd contenues dans le sédiment avant culture (sédiment préparé), un premier repérage des spots riches en Cd présent sur des grains de morphologie, de couleur et d'aspect différents, a été effectué au MEB sur les lames de sédiment végétalisé par *A. halleri* d'origine MET. Pour chaque spot, des cartographies élémentaires réalisées au MEB et en  $\mu$ XRF ainsi que les spectres EDS associés ont été enregistrés. Les analyses en  $\mu$ XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd et au seuil K du S ont aussi été effectuées. Suite à l'exploration et à l'analyse des lames, nous avons comparé les types de grains et de spots recensés, les types d'associations géochimiques rencontrées, et les différentes espèces identifiées sur les lames de sédiment végétalisé par les plantes MET. Ces espèces ont aussi été identifiées dans le sédiment végétalisé par les plantes N-MET. De ce fait, nous avons choisi de ne présenter dans les paragraphes suivants que quelques zones représentatives repérées quelles que soient les lames présentant des spots d'intérêt. Dans un premier temps, pour chacun des spots d'intérêt, nous présenterons les cartes de localisation du spot ainsi que les distributions élémentaires et les associations géochimiques trouvées dans la zone ; les résultats de ces observations ont été compilés dans un tableau récapitulatif (Tab. II-15). Dans un second temps, nous comparerons la spéciation du Cd et du S trouvées pour chaque point déterminée par spectroscopie  $\mu$ XANES. Par manque de temps, aucune microanalyse n'a été menée sur les lames du sédiment témoin.

#### **Particule 19 contenant les spots 19a, 19b et 19c**

La première zone repérée est en bordure d'une particule nommée « 19 » (Fig. II-44A, B). Cette zone observée au microscope en lumière naturelle montre un coloris « rougeâtre à brun » attestant la présence de Fe (Fig. II-44B). Les cartographies élémentaires obtenues (Fig. II-45) et les microanalyses (Fig. II-44C) montrent que Cd est présent dans deux spots, qui sont également riches en S, Fe, Zn, et Si et, dans une moindre mesure, P.

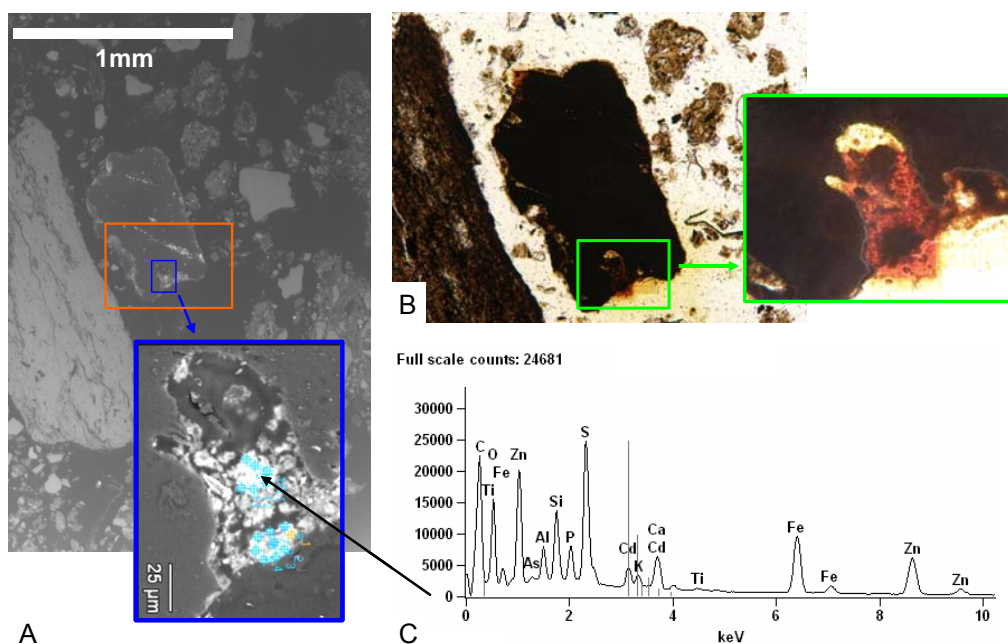


Figure II-44: (A) Image MEB (X 50 et X 350) en électrons rétrodiffusés d'une particule (nommée particule 19) du sédiment après culture contenant des zones riches en Cd. (B) Particule 19 observée à la loupe binoculaire. (C) Spectre EDS enregistré sur un spot riche en Cd du grain 19.

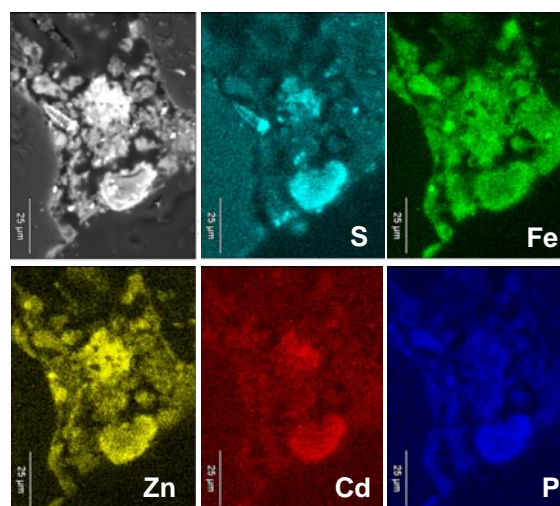


Figure II-45 : Image MEB en électrons rétrodiffusés de la zone riche en Cd du grain 19 et cartes élémentaires EDS associées pour le S, Fe, Zn, Cd et P.

Afin de réaliser une étude  $\mu$ XANES, une zone un peu plus large a été cartographiée par  $\mu$ XRF pour les éléments Cd, P, S, Si, Al, et Cl (Fig. II-46). Les cartes élémentaires permettent de localiser à nouveau le spot de Cd le plus concentré préalablement repéré

au MEB et de visualiser plus précisément les associations. Ainsi, le spot le plus riche en Cd (spot 19a) contient également S et P. Une autre zone riche en Cd située à droite de la première (spot 19b) est moins riche en S et P que cette dernière. Le point 19c correspond à une zone riche en S mais contenant peu de Cd. Bien que parfois le S, le Cd et le P soient co-localisés en un même spot, les diagrammes de corrélation entre S-Cd et P-Cd réalisés à l'échelle du grain montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre S et Cd et entre P et Cd ( $R^2=0.065$  et  $0.524$ , fig. II-46B). En revanche, il existe deux types d'associations du Cd et du S: des zones avec un ratio S/Cd élevé (exemple spot 19c), et des zones avec un ratio plus faible (exemple spot 19a ; Fig II-46B).

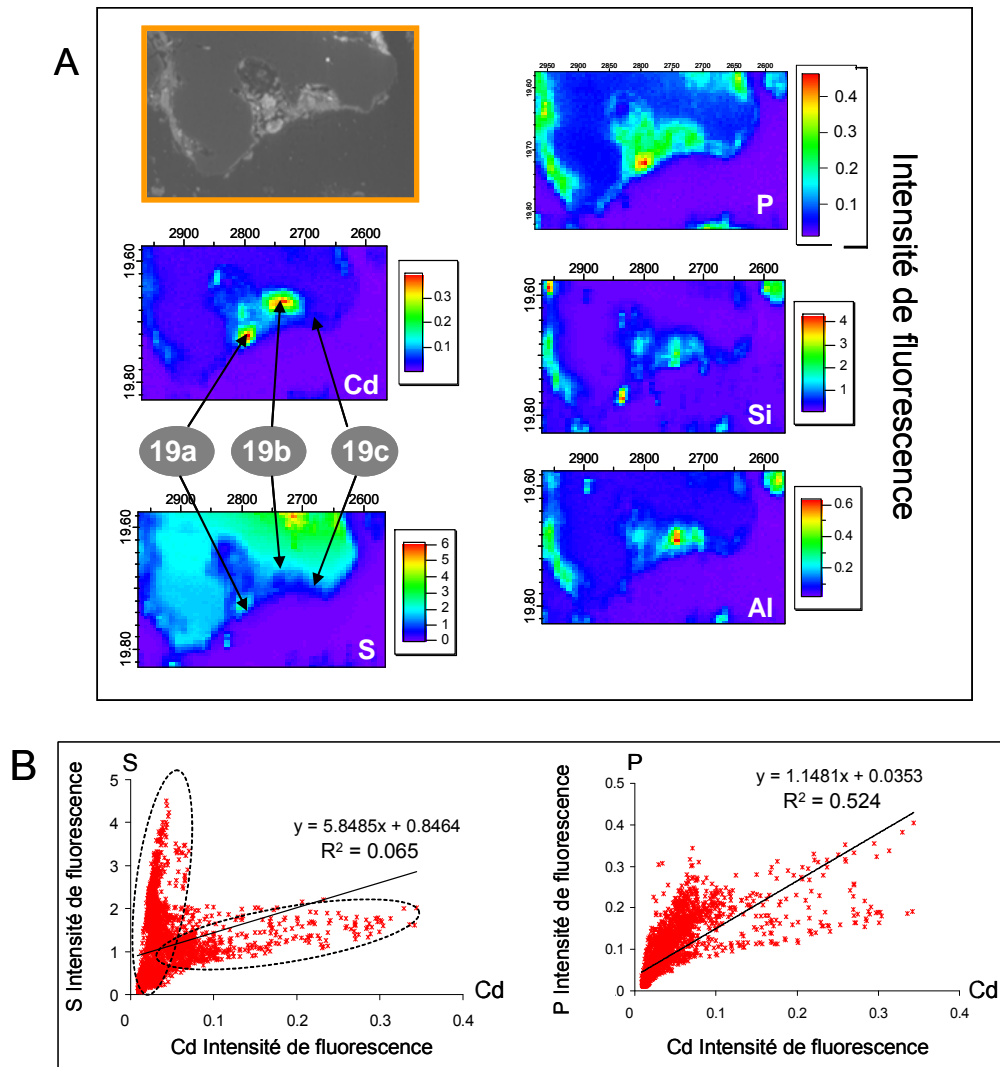


Figure II-46 : (A) Cartes élémentaires enregistrées en  $\mu$ -XRF de la distribution du Cd, S, P, Si et Al, sur le grain 19 issu du sédiment végétalisé par *A. halleri* d'origine MET à *t*5. (B) Diagramme des corrélations élémentaires correspondantes.

## Spot 16

Le spot 16 a été localisé sur un grain présentant des encroûtements de petites tailles (Fig. II-47A) qui sont riches en éléments lourds (fortes surbrillances très localisées – fig. II-47A). Ce spot paraît riche en Fe, S, Ca, Zn et contient aussi Si et P (spectre EDS, fig. II-47B). Les cartes obtenues par  $\mu$ XRF suggèrent une co-localisation du Cd, du S et du P (Fig. II-47C).

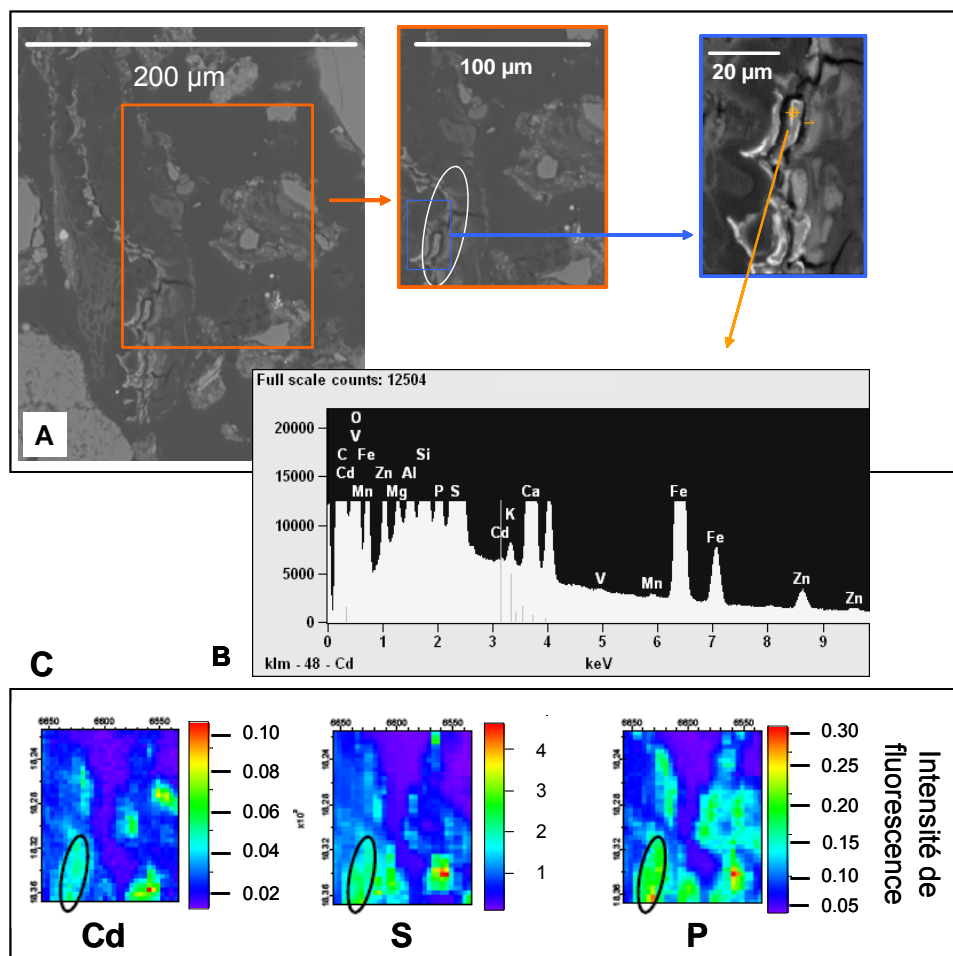


Figure II-47 : (A) Images MEB en électrons rétrodiffusés d'un grain du sédiment végétalisé (origine MET) après culture contenant une zone riche en Cd (zone encerclée en blanc nommée spot 16). (B) Spectre EDS enregistré dans la zone enrichie en Cd. (C) Distribution élémentaire du Cd, S et P sur la zone d'étude, le spot 16 étant encerclée en noir ( $\mu$ -XRF, pas de  $5\mu\text{m}$ , temps de comptage : 1s/pt). Des spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd et K du S ont été enregistrés dans cette zone délimitée en noir.

### Le spot 13

Le spot 13 a été localisé sur un grain de couleur rougeâtre (observation à la loupe binoculaire - image non présentée). Une longue bande en bordure de grain apparaît en surbrillance sur l'image en électrons rétrodiffusés (Fig. II-48A). L'analyse EDS d'un point de cette zone montre une composition assez proche de celle du spot 16 (Fig. II-48B).

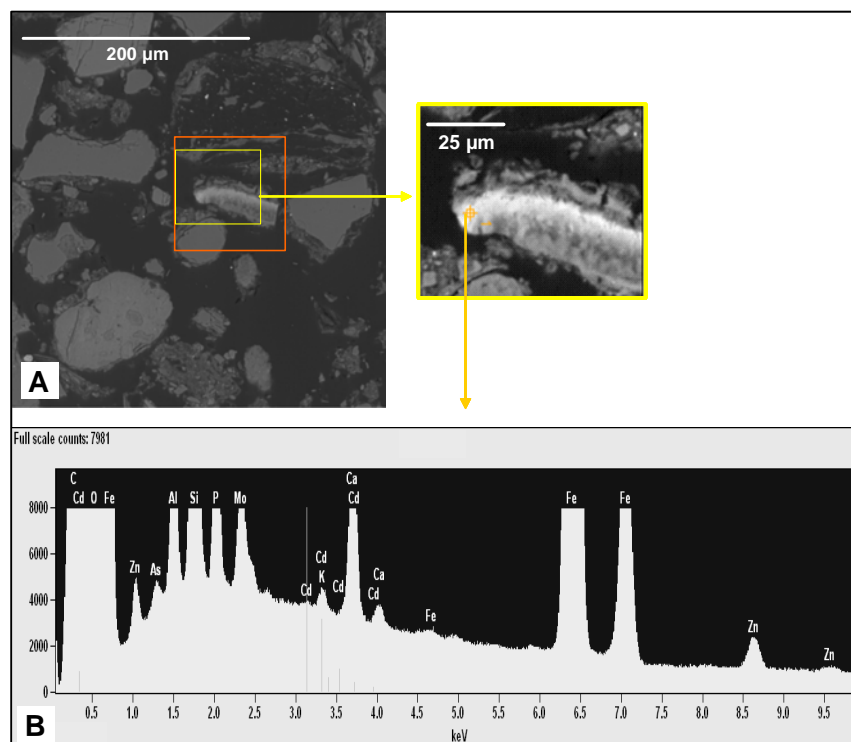


Figure II-48 : (A) Image MEB (X 200 et X 700) en électrons rétrodiffusés du grain du sédiment végétalisé après culture contenant une zone riche en Cd : le spot 13. (B) Spectre EDS enregistré sur un point du spot 13 enrichi en Cd.

Les cartographies réalisées en  $\mu$ XRF montrent une co-localisation du Cd et du P, et dans une moindre mesure avec S (Fig. II-49). La zone la plus intense en bas à gauche de la carte de Cd n'est pas prise en compte car les intensités sont fausses. Ce grain est très riche en Si. Or l'énergie de la raie de fluorescence  $K\alpha$  de Si est à 1740 eV. Le double de cette valeur est égal à 3480 eV, ce qui coïncide avec l'énergie des raies de fluorescence  $L\beta$  de Cd (3315 à 3526 eV). Lorsque le détecteur est proche de la saturation, il



discrimine mal les photons, et compte un photon de fluorescence de Cd au lieu de deux photons de fluorescence de Si. Ce phénomène est appelé effet d'empilement.

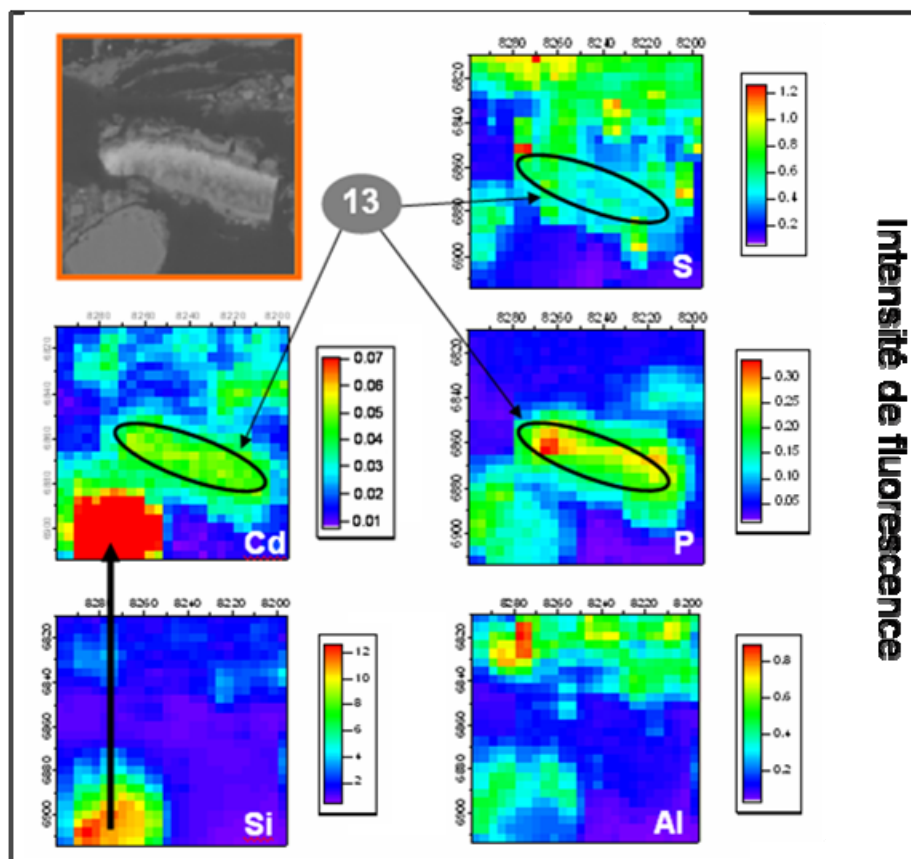


Figure II-49: (A) Image MEB en électrons rétrodiffusés du grain du sédiment végétalisé après culture contenant une zone riche en Cd. (B) Distribution élémentaire en  $\mu$ -XRF du Cd, S, P, Si et Al sur la zone d'étude (pas de  $4\mu\text{m}$ , temps de comptage : 1s/pt), le spot 13 étant cerclé en noir. Des spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd et K du S ont été enregistrés dans cette zone délimitée en noir.

#### Objet organique : fragment de racine

Nous avons également étudié un fragment organique présent dans la lame mince de sédiment végétalisé. Des parois cellulaires sont bien visibles en microscopie optique. Cet objet présente les mêmes caractéristiques morphologiques et chimiques que des racines de plantes prélevées lors du démontage des pots, lyophilisées et analysées par MEB-EDS (annexe II-8). Il s'agit donc très probablement de racines d'*A. halleri*. Les cartographies élémentaires réalisées par MEB-EDS montrent que S est associé aux parois cellulaires, et Fe est présent sous forme de précipités distribués dans ou sur la

racine (Fig. II-50). Cd et Zn ne sont pas détectés en EDS (Fig. II-50). Par contre, l'analyse  $\mu$ XRF a permis de localiser Cd dans ce fragment de racine (Fig. II-51). La zone riche en Cd est aussi la plus riche en S, et elle contient aussi P.

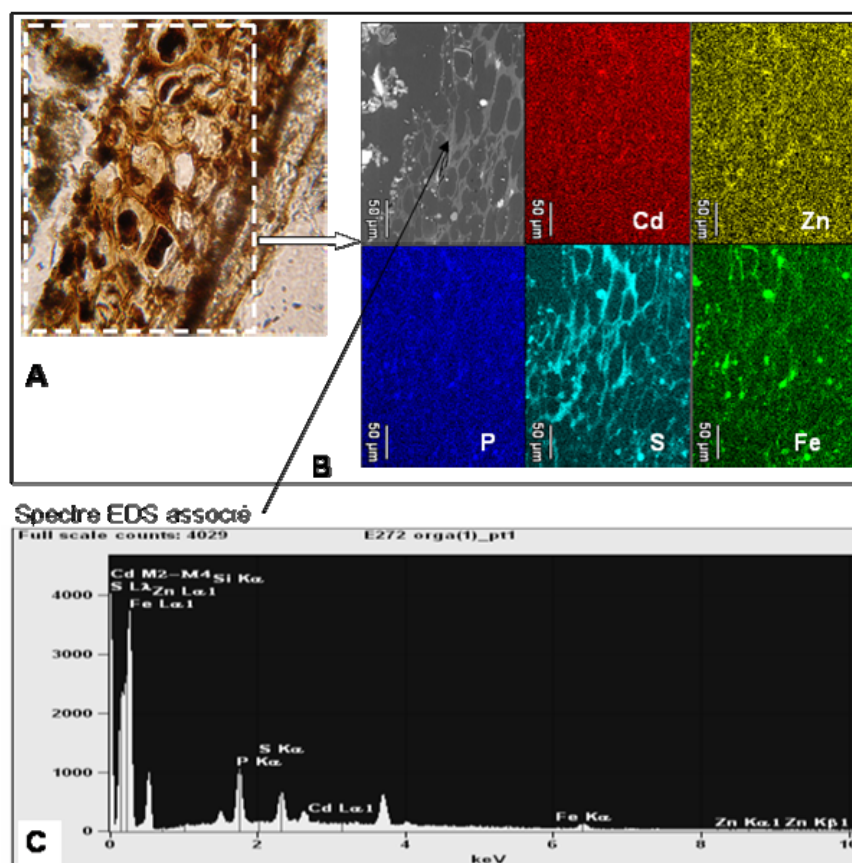


Figure II-50: (A) Spot « orga » observé au microscope optique. (B) Image MEB en électrons rétrodiffusés de la zone « orga » et cartographies élémentaires associées. (C) Spectre EDS enregistré sur ce spot.

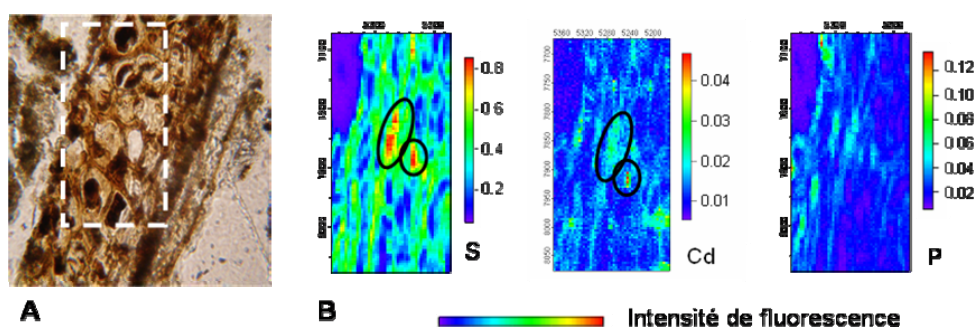


Figure II-51: (A) Spot « orga » observé au microscope optique. (B) Distribution élémentaire par  $\mu$ -XRF du Cd, S, P et Si sur la zone d'étude (pas de 5  $\mu$ m, temps de comptage 1s/pt), le spot « orga » étant cerclée en noir. Des spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil L<sub>III</sub> du Cd et K du S ont été enregistrés dans cette zone délimitée en noir.

### Récapitulatif des spots étudiés et présentés après culture

Toutes les associations géochimiques mises en évidence dans les paragraphes précédents sont compilées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II-15 : Rapports de fluorescence S/Cd et P/Cd pour les spots analysés sur la lame mince de sédiment végétalisé par *A. halleri* d'origine MET.

Nom de l'échantillon	Rapports de fluorescence		Remarques
	S/Cd	P/Cd	
Point 19a	5.9	1.2	} sur un grain très riche en Zn et Fe → point 19c : Cd très diffus
Point 19b	4.8	0.6	
Point 19c	17.5	2.9	
Point 16	38.0	3.7	sur un grain riche en Zn, Fe et Ca
Point 13	8.3	4.5	sur un grain très riche en Fe et Ca, avec un peu de Zn (grain rouge)
Orga	37.5	2.4	dans et/ou sur une racine riche en Zn, Fe. Cd diffus

#### II.3.3.3.2. Identifications des espèces individuelles : Analyses $\mu$ XANES

Afin de déterminer la spéciation de Cd dans les différentes zones précédemment décrites, nous avons effectué des analyses  $\mu$ XANES sur ces zones.

Les spectres  $\mu$ XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd du sédiment après culture sont comparés à deux spectres du sédiment avant culture sur la figure II-52. Les spectres des points 16, 13, 19c et « orga » présentent un pré-pic aux alentours de 3538 eV. Ce pré-pic est caractéristique d'une liaison Cd-O. A l'inverse, les spectres des points 19a et 19b n'ont pas de pré-pic et ressemblent à ceux des échantillons avant culture. Cela suggère que le Cd présent aux points 19a et 19b est associé à du S réduit.

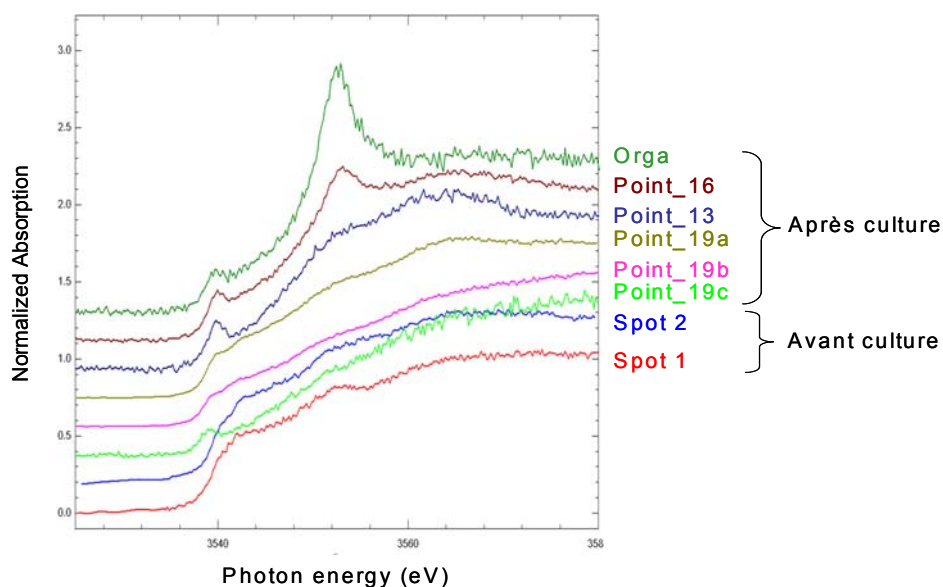


Figure II-52: Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd sur les spots enrichis en Cd repérés sur la lame de sédiment après culture d'*A. halleri* : points 19a, 19b et 19c du grain 19, le point 16, le point 13 et le point « orga ». Les spectres des spots 1 et 2 du sédiment préparé sont aussi représentés à titre de comparaison.

Les résultats des combinaisons linéaires sont présentés dans le Tableau II-16 et les figures II-53 (détails des CL en Annexe II-7, tab. E). Toutes les espèces dont le spectre présente un pré-pic (orga, spots 13, 16 et 19c) sont simulés par des espèces contenant le ligand O. Par exemple, le spectre enregistré au point 13 est correctement simulé par l'association de spectres de Cd-phosphate ( $80 \pm 7 \%$ ) et Cd-acides organiques ( $15 \pm 2 \%$ ). Les spectres des autres spots (19a, 19b et 19c) sont simulés par un mélange de ligands S (minéral ou organique) et Cd-O (Tab. II-16). On remarque aussi que la spéciation du Cd est différente entre trois spots d'une même zone relativement proches entre eux latéralement (spots 19a, 19b et 19c analysés sous un faisceau de  $2 \times 2 \mu\text{m}$ ). Pour un spot très riche en Cd et S, le Cd est principalement présent sous la forme d'un sulfure minéral et/ou organique (spots 19a et 19b – Tab. II-16), alors que le Cd est principalement associé à des ligands O pour un spot où le Cd est plus diffus (spots 19c, 13) et pour un spot riche en P, le Cd est plutôt présent sous la forme de Cd-phosphate (spot 13).

Pour les points 16 et « orga », la présence d'un artefact (pic de diffraction) sur une portion importante du spectre influence la forme du spectre expérimental, et par

conséquent les résultats des CL. En revanche, le pré-pic caractéristique de l'O est bien présent, le Cd présent aux points 16 et « orga » est bien sous forme oxydée.

Tableau II-16 : Spéciation du Cd déterminée par combinaisons linéaires avec 4 composantes au maximum dans le sédiment avant culture (sédiment préparé) et dans le sédiment après 5 mois de culture par *A. halleri*.

		Contribution (en %) des différents spectres de références pour simuler le spectre expérimental			
Noms des échantillons		(Zn,Cd,Fe)S *	Cd-thiols	Cd-phosphates	Cd-acides organiques
avant culture	sediment préparé (signal global)	99**	-	-	-
	spot 1	88 ± 8	18 ± 8	-	-
	spot 2	104*	-	-	-
après culture	orga	-	-	-	101**
	pt 16	-	-	20 ± 1	80 ± 2
	pt 13	-	-	80 ± 7	15 ± 2
	pt 19c	[ 7 ± 2 ]***		-	70 ± 2
	pt 19b	-	62 ± 1 %	-	15 ± 2 %
	pt 19a	29 ± 3 %	39 ± 4 %	-	25 ± 2 %

Valeurs = moyenne ± écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les simulations par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* contenant éventuellement une faible proportion de CdS.

\*\* Ajustement par CL réalisé avec une seule composante – valeur du meilleur ajustement obtenu.

\*\*\* Valeurs regroupant les résultats des contributions des sulfures (sous forme minérale et organiques)

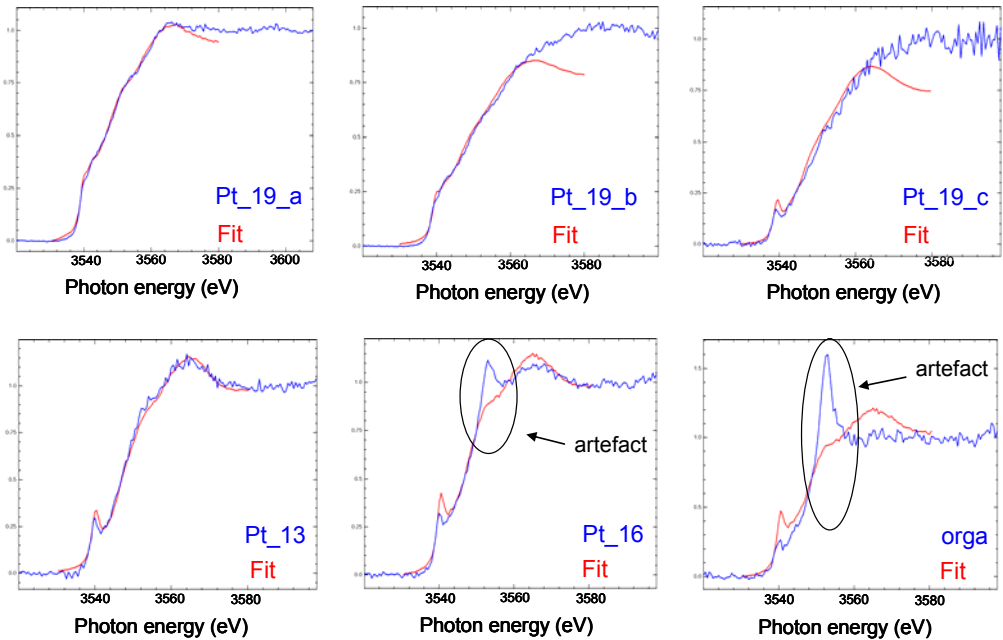


Figure II-53 : Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil  $L_{III}$  du Cd dans les zones riches en Cd du sédiment végétalisés par *A. halleri* à  $t_5$ , et ajustement des spectres par combinaison linéaire (rouge).

Le Cd contenu dans les espèces individuelles est donc présent sous forme réduite mais aussi sous forme oxydée. Les associations géochimiques ont montré la forte présence de S au niveau des spots de Cd. Des spectres  $\mu$ XANES ont été enregistrés au seuil K du S sur les mêmes spots précédemment étudiés au seuil  $L_{III}$  du Cd (Fig. II-54). Ces spectres sont tous différents. Cependant ils présentent tous un premier pic à 2473 eV, qui est caractéristique de la présence de S réduit. Dans toutes les espèces individuelles de Cd détectées dans le sédiment après culture, il existe du S sous forme réduite. En outre, certains spectres, à savoir les points 16, 13, 19c, 19a et « orga » comportent un pic à 2482 eV (Fig. II-54). Ce pic est caractéristique de la présence de S oxydé.

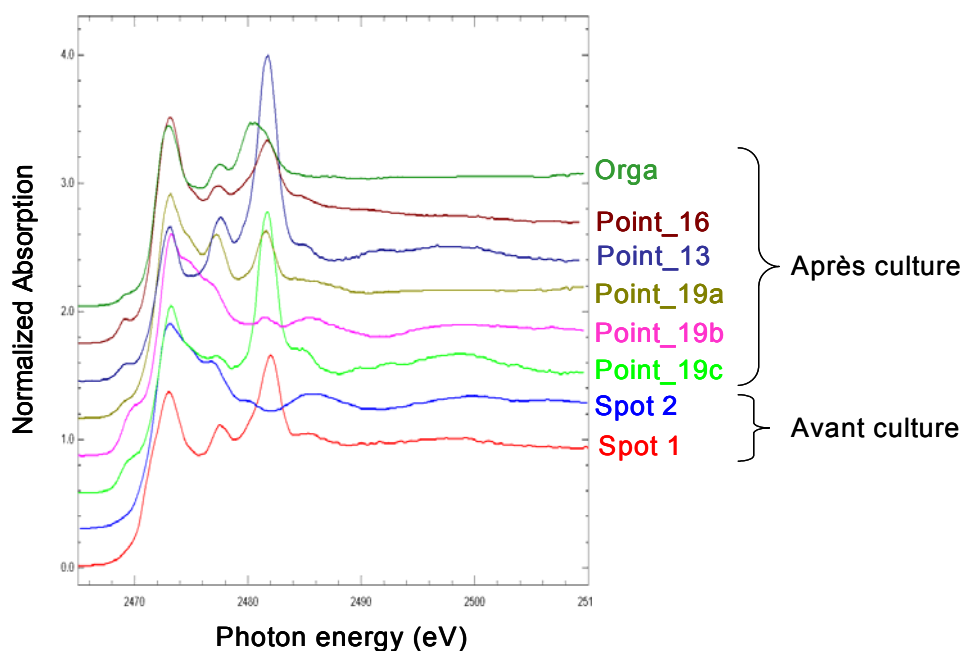


Figure II-54: Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots enrichis en Cd repérés sur la lame de sédiment après culture d'*A. halleri* : points 19a, 19b et 19c du grain 19, le point 16, le point 13 et l'« orga ». Les spectres des spots 1 et 2 du sédiment préparé avant culture sont aussi représentés à titre de comparaison.

La distribution des espèces soufrées déterminée par combinaison linéaire est présentée dans le Tableau II-17 (détails en annexe II-7, tab. F). Toutes les zones analysées sauf le spot 19b contiennent un mélange d'espèces réduites (minérale + organique) et oxydées. Le spot 19b contient uniquement du S réduit sous forme minérale ( $82 \pm 2$  %) et sous

forme organique ( $17 \pm 3 \%$ ) (Tab. II-17 et fig. II-55). Cette distribution est comparable à celle observée au spot 1 du sédiment initial.

Comme observé précédemment pour le sédiment avant culture, dans chaque zone contenant du Cd, le S est présent sous différents états d'oxydation allant de -II (sulfure) à +VI (sulfate). Le cadmium quant à lui est toujours lié à la fois à des sulfures (minéraux ou organiques) et à des acides organiques et/ou phosphates - sauf dans les zones purement organiques. Ceci suggère que toutes les espèces individuelles de Cd n'ont pas été oxydées au cours de la culture bien que le sédiment soit relativement oxydé.

Tableau II-17: Spéciation du S simulée par combinaison linéaire pour le sédiment préparé et pour des zones riches en Cd contenues sur des grains du sédiment préparé (spot 1 et spot 2). Les combinaisons linéaires ont été simulées avec 5 composantes au maximum.

Noms des échantillons		Contribution (%) des différents spectres de références pour simuler le spectre expérimental				
		Sulfures sous forme minérale	Sulfures organiques Groupes thiols	Sulfoxydes	Acides sulfoniques	Sulfates
avant culture	sédiment préparé (signal global)	$89 \pm 2$	-	-	$[ 9 \pm 2 ]^*$	
	spot 1	$47 \pm 6$	$25 \pm 7$	-	$[ 10 \pm 3 ]^*$	
	spot 2	$71 \pm 6$	$22 \pm 6$	$5 \pm 1$	-	-
après culture	orga	$62 \pm 9$	$21 \pm 7$	-	$12 \pm 2$	-
	pt 16	$48 \pm 2$	$45 \pm 2$	-	$8 \pm 1$	-
	pt 13	$23 \pm 3$	$45 \pm 2$	-	$15 \pm 1$	$20 \pm 6$
	pt 19c	$65 \pm 2$	$17 \pm 1$	-	$11 \pm 1$	$7 \pm 5$
	pt 19b	$82 \pm 2$	$17 \pm 3$	-	-	-
	pt 19a	$62 \pm 2$	$33 \pm 2$	-	$6 \pm 1$	-

Valeurs = moyenne  $\pm$  écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les simulations par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 10 %).

\* Valeurs regroupant les résultats des contributions des acides sulfoniques et des sulfates

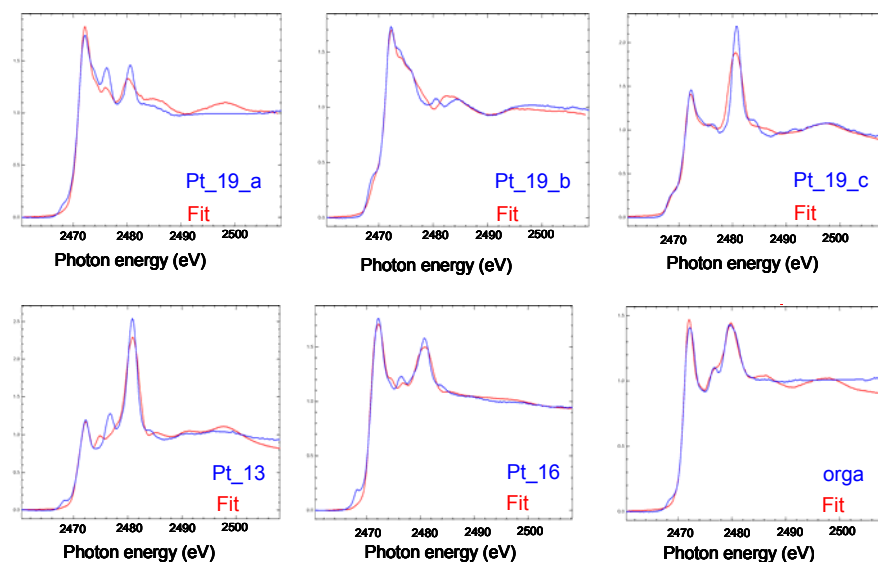


Figure II-55 : Spectres  $\mu$ XANES enregistrés au seuil K du S sur les spots riches en Cd repéré dans le sédiment des pots végétalisés par *A. halleri* à t5, et meilleure simulation par combinaison linéaire (rouge).

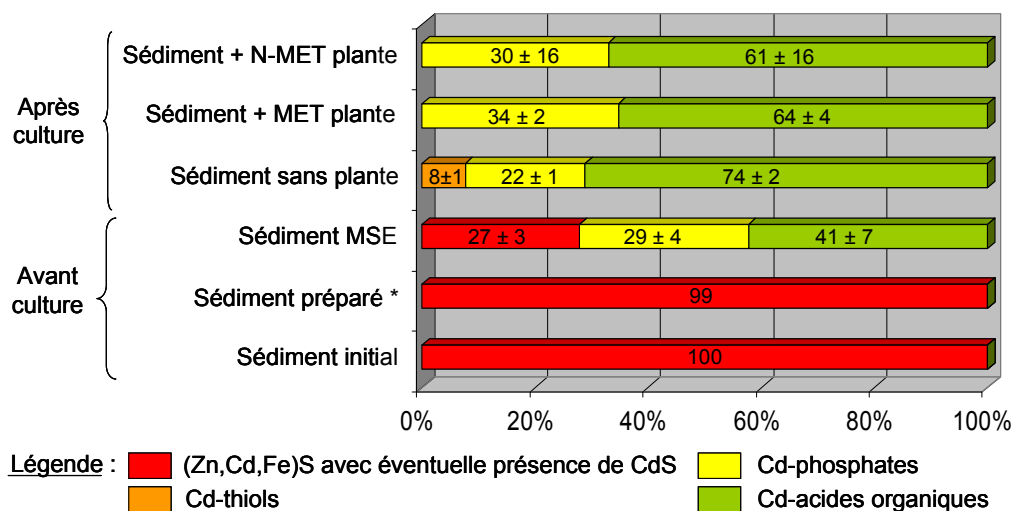
#### II.3.3.4. Spéciation dans le sédiment après culture : bilan

Les résultats des analyses globales réalisées en EXAFS au seuil K du Cd sur le sédiment après culture d'*A. halleri* quelle que soit son origine, montrent que la spéciation du Cd et de S dans le sédiment ont évolué. Alors qu'avant culture le Cd est associé à du S réduit, après culture il est principalement associé à des acides organiques ( $\approx 60\%$ ), mais aussi à des phosphates ( $\approx 30\%$ ) (Fig. II-56). Dans le sédiment non végétalisé après 6 mois d'expérience, le Cd est aussi majoritairement associé à des acides organiques ( $74 \pm 2\%$ ) et à des phosphates ( $22 \pm 1\%$ ) mais il reste une contribution faible mais néanmoins significative des espèces présentant du Cd associé à du S réduit ( $8 \pm 1\%$  de sulfures organiques) (Fig. II-56).

La comparaison des résultats pour le sédiment végétalisé, le sédiment seul et le sédiment mis sous eau (MSE) suggère que l'impact de la plante n'est pas prépondérant sur le changement de spéciation du Cd. Il semblerait que la mise en pot, l'arrosage et l'alternance périodique de phase de séchage et d'humidification aient une influence majeure sur la spéciation du Cd. Ils pourraient favoriser les processus d'oxydation abiotique et microbienne. Toutefois, il semblerait qu'en présence de plante, la part de



Cd-phosphates soit légèrement plus importante, ce qui suggère que la plante au *sensu stricto* du terme a un impact sur la formation de nouvelles espèces.



\* Analyse réalisée en XANES au seuil  $L_{III}$  du Cd

Figure II-56: Proportions des espèces de Cd dans l'ensemble des échantillons de sédiment avant et après culture déterminées par simulation des spectres EXAFS expérimentaux.

Par microanalyse X, les mêmes associations géochimiques sont trouvées entre le Cd et le S, le Zn et le Fe avant et après culture. Une co-localisation Cd-P est observée mais nous n'avons pas trouvé d'association Cd-phosphate avant culture. En revanche, après culture, du Cd-phosphate est identifié en certains points, *i.e.* pour les rapports de fluorescence P/Cd les plus élevés.

Les microanalyses XANES réalisées au seuil  $L_{III}$  du Cd pour le sédiment avant culture montrent que toutes les espèces de Cd identifiées sont des sulfures. Après culture, nous avons recensé quelques spots où le Cd est majoritairement associé à des sulfures (spot 19a), mais nous avons aussi observé de nouvelles espèces où le Cd est principalement associé à des phosphates (spot 13) ou à des acides organiques (spot 19c). En revanche, les microanalyses réalisées au seuil K du S sur les mêmes zones d'analyses menées au seuil  $L_{III}$  du Cd montrent que quel que soit le spot enrichi en Cd, le S associé est majoritairement présent sous forme de sulfures (70 à 100 %). Les résultats au seuil K du S montrent aussi que sur certains spots, une partie du S est sous forme oxydée.

### II.3.3. Discussion

#### II.3.3.1. Spéciation dans le sédiment avant culture

Dans cette étude, nous avons montré que le Cd présent dans le sédiment avant culture était présent sous forme d'un sulfure métallique bien cristallisé contenant environ 2/3 de Zn, 1/3 de Cd et des traces de Fe.

La spéciation du Cd dans des sédiments de curage très contaminés a été peu étudiée par des méthodes de caractérisation directes. En revanche, il existe des données EXAFS sur des sédiments marins prélevés dans des ports et contaminés par plusieurs métaux dont Zn et Cd. Carroll et al. (2002) ont ainsi montré que le cadmium était présent sous forme de sulfure, mais l'absence de 2<sup>ème</sup> voisins sur la transformée de Fourier indique qu'il s'agissait probablement d'un sulfure nanocristallin voire amorphe. A l'inverse, O'Day et al. (1998) ont identifié du Cd lié à de la sphalérite (ZnS) dans un sédiment impacté par des activités minières (U.S. Tri-State Mining District ; Kansas – Missouri - Oklahoma). Les paramètres structuraux déterminés pour les couches de S, Zn et Cd sont assez proches des nôtres. Par contre, les auteurs identifient un carbonate de Cd comme espèce secondaire.

Les sulfures métalliques présents dans le sédiment contiennent probablement des teneurs variables en Zn, Fe et Cd. Le fait que les spectres  $\mu$ XANES au seuil L<sub>III</sub> de Cd n'aient pas été reconstruits de façon très satisfaisante par CL renforce cette hypothèse. La spéciation moyenne de Cd dans le sédiment est assez proche de celle du Cd dans le sulfure mixte de référence, par contre à l'échelle microscopique des sulfures avec des rapports Cd/Zn et Cd/Fe très différents peuvent exister.

La spéciation du zinc dans un sédiment de la Scarpe voisin de notre sédiment d'étude a été étudiée en microanalyse et EXAFS par Isaure et al. (2002). Il a été montré que dans le sédiment fraîchement curé, le Zn était présent à 60-70% sous forme de ZnS et à 30-40% associé à des oxyhydroxydes de fer mal cristallisés. La présence de Cd en impureté dans la sphalérite n'avait pas été observée, ce qui peut être expliqué par la différence de concentration de 2 ordres de grandeur entre les éléments Zn et Cd. Dans notre étude, nous n'avons pas détecté de Cd associé à des oxydes et/ou oxyhydroxydes de fer (ni à aucun ligand porteur de groupements OH) dans le sédiment avant culture.

Les sulfures métalliques peuvent être d'origine anthropique ou diagénétique. Les travaux de Isaure et al. (2002) ont montré que la présence des sulfures de zinc dans les fractions grossières était liée aux scories issues de l'activité métallurgique voisine ; Sobanska et al. (1999) ont par ailleurs identifié les sulfures de plomb et de zinc comme les constituants majeurs de poussières émises par cette activité, à l'origine de la pollution diffuse des sols environnants. Le Cd présent dans les sédiments de notre étude peut provenir des mêmes sources, car il est associé au minerai qui est exploité sur le site.

Lorsque des métaux sont présents dans la colonne d'eau d'un écosystème aquatique, le plus souvent associés aux matières en suspension, ils se déposent en surface des sédiments et sont inclus dans les transformations géochimiques ayant lieu à l'interface eau-sédiments et dans le compartiment sédimentaire (Lesven et al., 2008 ; Billon, 2001). La dégradation bactérienne de la matière organique des sédiments, en réduisant divers donneurs d'électrons comme les oxydes de fer et de manganèse et les sulfates entraîne le relargage de métaux dans la porosité du sédiment, la formation, puis la précipitation de sulfures métalliques. Les sulfures ainsi formés en subsurface des sédiments sont généralement peu stables, mal cristallisés et facilement oxydables ; ils sont regroupés sous l'appellation AVS (Acid Volatile Sulfides). Cependant, les AVS sont stabilisés en profondeur où l'anoxie est plus présente et peuvent voir leur cristallinité augmenter.

Des travaux relatifs aux AVS confirment leur rôle dans le piégeage du Cd dans les sédiments. A partir de la connaissance des eaux interstitielles et de calculs thermodynamiques, Billon (2001) montre que sur des sédiments d'estuaires, le Cd, comme Pb, Cu et Zn, peut à la fois s'insérer dans des carbonates sous forme de solution solide et former en parallèle des phases discrètes avec les sulfures. Dans des sédiments fluviaux du Nord de la France et de Belgique, Lesven et al. (2008) ont montré à partir de mesures par DGT et DET dans le profil sédimentaires que Cd, Co, Cu, Ni et Pb sont efficacement piégés dans les AVS.

Des approches indirectes ont également été utilisées pour étudier la spéciation des métaux dans des sédiments de la Scarpe, très voisins de ceux de notre étude. Piou et al. (2009) et Vansimaey et al. (2009) ont exploré à l'aide d'attaques chimiques l'évolution de la répartition des formes métalliques dans les sédiments lors de leur vieillissement lié

à la mise en dépôt après curage. A partir d'un schéma d'extraction en 5 étapes, Piou et al. (2009) montrent que dans les sédiments fraîchement curés, près de 90 % des teneurs totales en Cd du sédiment sont extraites par l'acétate d'ammonium à pH 2 et 10% sont extraites par l'acétate d'ammonium à pH 5. Ces résultats, s'ils ne permettent pas d'identifier fermement les phases porteuses du Cd, sont cohérents avec l'identification de sulfures de Cd.

Vansimaey et al. (2009) ont cherché à identifier les formes métalliques associées aux phases les plus mobiles (extraction au nitrate de calcium 0.01 M) et les plus sensibles à l'oxydation, soit la matière organique (dissolution par du pyrophosphate 0.1 N) et les oxydes de fer (CBD). Dans les sédiments frais, le cadmium est mis en solution uniquement par dissolution de la matière organique et ce, en très faible proportion (<10%). Ce résultat est en cohérence avec le fait que nous n'ayons pas identifié de Cd associé à des oxydes de fer dans les sédiments avant culture.

#### **II.3.3.2. Spéciation dans le sédiment après culture**

Dans tous les pots étudiés, qu'ils soient végétalisés ou non, le Cd est majoritairement sous forme +2 ; on le retrouve essentiellement associé à des acides organiques et à des phosphates de Cd. Lorsque l'on procède à une analyse des grains, on observe ponctuellement du cadmium associé à des sulfures sur certains échantillons, mais CdS ne représente plus qu'une phase très minoritaire à l'échelle globale. Cette phase est détectée à l'échelle globale à hauteur de 8% dans les pots non végétalisés, et non détectée dans les pots végétalisés. Précédemment, Panfili et al. (2005) ont suivi l'évolution de la spéciation de ZnS dans un sédiment de curage issu de la Scarpe végétalisé ou non par 2 graminées (*Agrostis tenuis* et *Festuca rubra*). Les auteurs ont montré qu'après 18 mois, les plantes augmentent le taux d'oxydation de la sphalérite (ZnS à 49% sans plante, et ZnS à 6% avec plante) et que le Zn contenu dans le sédiment est associé à des phosphates (49%) et dans une moindre mesure à des phyllosilicates et/ou hydrotalcites zincifères. Ils ont aussi observé que l'oxydation de ZnS est plus rapide en présence de plante qu'en présence d'amendement seul (scories Thomas ou hydroxylapatite).

Dans notre étude, la durée de culture était de 5 mois pendant lesquels le sulfure mixte de Zn, Cd, Fe identifié avant mise en culture a été presque totalement oxydé, même en

absence de plantes. Dans l'étude de Panfili et al. (2005) après 18 mois, le sulfure de Zn n'a été oxydé qu'à moitié en absence de plantes, et quasi complètement en présence de plantes. Ceci suggère une plus grande sensibilité à l'oxydation pour le sulfure mixte.

Les cycles de séchages-humidifications (arrosage) auxquels sont soumis les pots lors de l'expérience peuvent être en partie responsable de cette oxydation. Lors des phases de séchage, la réduction de la teneur en eau du sédiment a généré des fissures qui favorisent des chemins préférentiels. Ce changement de structuration est aussi observé par Tessier et al. (1994) et Crosnier & Delolme (2002), lesquels ont observé une augmentation du taux d'oxydation. De plus, Mitchell and Baldwin (1998) ont rapporté que ces cycles accélèrent la décomposition et la minéralisation des composés les plus labiles. Nous avons d'ailleurs vu lors de la séparation granulométrique et de l'essai de mise en suspension que les sulfures sont rapidement déstabilisés.

Bien que l'oxydation des sulfures s'opère dans les pots sans plante, la présence de plantes semble favoriser ce processus. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette oxydation accrue:

- L'intrusion de racines dans le sédiment augmente l'apport en  $O_2$  dissous en augmentant le drainage de l'eau et l'aération du sédiment (Marseille et al., 2000 ; Bert et al., 2003). Cet effet prédomine sur l'effet de la respiration racinaire laquelle, à l'inverse, appauvrit la rhizosphère en  $O_2$  l'enrichit en  $CO_2$  (Marschner 1995 ; Hinsinger et al., 2003). De plus, de par l'absorption de métaux par l'ensemble des racines, la plante peut modifier les propriétés rédox des substrats compacts (Marseille et al., 2000).
- L'activité microbienne est stimulée dans la rhizosphère en raison du flux de molécules organiques et de substances nutritives minérales (Bert al., 2003). Les microorganismes qui sont fermement associés avec les racines modifient localement les propriétés des sols en exsudant des molécules organiques et en échangeant des ions ( $H^+$ ,  $OH^-$ ,  $HCO_3^-$ ...) avec la solution de sol (Marschner, 1995 ; Hinsinger 1998, 2009). Il en est de même pour les champignons (Sarret et al., 2003). En outre, quelques microorganismes utilisent leur énergie pour l'oxydation des sulfures (*thiobacillus sp.*, Francis et al., 1989 ; Qureshi et al., 2003). L'action des bactéries naturellement présentes dans les sédiments sur la

mobilité des métaux a été montré sur des sédiments similaires (Lors et al., 2004). Ces bactéries sont naturellement présentes dans le sédiment.

Les principales formes du cadmium identifiées dans les pots végétalisés sont du Cd associé à des phosphates (entre 30 et 34 %) et du Cd associé à des acides organiques (61 à 64%). Ces résultats sont identiques pour les deux origines d'*A. halleri*. En absence de plante, en plus de ces deux espèces, on identifie du Cd associé à des thiols.

L'affinité du Cd pour la matière organique du sol est connue. Si le groupement fonctionnel auquel le Cd est lié a été identifié comme étant essentiellement un acide et à plus faible proportion des groupements thiols dans les sédiments non végétalisés, la nature de la phase organique à laquelle le Cd est associé ne peut être précisée par les techniques mises en œuvre : petits acides organiques ou substances humiques, débris végétaux ou même polluants organiques. La caractérisation directe de la nature des associations est rapportée pour des sols organiques par Karlsson et al. (2005). Les auteurs ont mis en évidence par EXAFS sur des échantillons très contaminés en cadmium, des complexes de Cd avec des groupements thiols dans une configuration tétraédrique et des complexes octaédriques Cd-ligands O/N ; la proportion des deux espèces est dépendante de la concentration en Cd. Les travaux de Vansimaey et al. (2009) sur le rôle de la matière organique et les oxydes de fer dans le vieillissement des sédiments ont été appliqués à des sédiments mis en dépôt depuis une dizaine d'années dans différentes conditions d'hydromorphie ; les auteurs ont mis en évidence une augmentation drastique de la fraction liée à la matière organique de moins de 10% du Cd total dans le sédiment frais à 65% dans un dépôt bien drainé. Dans un dépôt resté en conditions hydromorphes, cette fraction n'a pas évolué. Les travaux de Piou et al. (2009) sur le suivi saisonnier de sédiments mis en dépôt mettent également en évidence le rôle du cycle de la matière organique dans la rétention des métaux et en particulier du Cd et du Zn. Dans les deux études, les auteurs identifient une fraction du Cd associée aux oxydes de fer. Dans notre étude, l'absence d'association Cd-oxydes de fer pourrait être liée aux spectres de références utilisés : les modèles pour cette association contiennent des teneurs en Cd très élevées, et ne sont peut-être pas adaptés à nos échantillons. Des essais de combinaisons linéaires avec des références moins concentrées permettraient de lever le doute sur la présence de ces phases.

L'association de Cd aux phosphates n'est pas surprenante car le sédiment est riche en phosphore. Il est probable que les concentrations en  $\text{Cd}^{2+}$  et phosphate dans la solution de sol dépassent la limite de solubilité du phosphate de Cd, formant ainsi des précipités visibles/repérables en MEB. De plus, l'activité racinaire peut augmenter la concentration en ions phosphates dans la rhizosphère. En effet, le P est l'un des éléments nutritifs les moins mobiles dans le sol (Hinsinger et al., 1998), les plantes ont donc développé des mécanismes pour augmenter la biodisponibilité du P, tels que l'exsudation de protons (Bertrand et al., 1999 ; Neumann et al., 1999), d'acides organiques et d'anions (Marschner, 1995 ; Neumann et al., 1999).

Les résultats d'EXAFS ne permettent pas de déterminer si l'association Cd-phosphate reflète une substitution de Cd dans des minéraux phosphatés, une adsorption ou précipitation à leur surface, ou la néoformation de phosphates de Cd à partir de la solution de sol. Dans leurs travaux sur l'apport d'amendements à base de phosphates à des sols pollués en Pb, Cd et Zn pour limiter leurs phyto- et bio-disponibilité, Brown et al. (2004) privilégient la formation de complexes ou précipités de surface, en raison de l'influence du pH sur les résultats de disponibilité.





# Chapitre III

**Localisation et spéciation du Cd dans  
les parties aériennes d'*A. halleri*.**

## Sommaire

### CHAPITRE III : LOCALISATION ET SPECIATION DU CADMIUM DANS LES PARTIES AERIENNES D'*A. HALLERI* ..... 197

<b>III.1. LOCALISATION DU Cd DANS <i>A. HALLERI</i>.....</b>	<b>200</b>
<i>Cd localization and compartmentalization in the hyperaccumulator Arabidopsis halleri studied by autoradiography. ....</i>	<i>200</i>
III.1.1. ABSTRACT .....	201
III.1.2. INTRODUCTION.....	201
III.1.3. MATERIALS AND METHODS .....	204
III.1.3.1. Plant material and culture .....	204
III.1.3.2. Root growth assessment and plant aspect.....	205
III.1.3.3. Zn and Cd accumulation in aerial parts of plants.....	205
III.1.3.4. Cd localization and compartmentalization in aerial parts of plants .....	205
III.1.3.5. Statistical analyses .....	208
III.1.4. RESULTS .....	208
III.1.4.1. Assessment of root growth and plant aspect.....	208
III.1.4.2. Cd and Zn concentrations in aerial parts of plants .....	208
III.1.4.3. Comparison of Cd accumulation and radioactive intensity .....	209
III.1.4.4. Localization of Cd at the rosette scale.....	210
III.1.4.5. Cd compartmentalization at leaf scale.....	211
III.1.5. DISCUSSION .....	212
III.1.5.1. Zn and Cd accumulation.....	212
III.1.5.2. Cd localization and compartmentalization at plant and leaf scale. ....	214
III.1.6. ACKNOWLEDGMENTS .....	216
III.1.7. REFERENCES.....	217
 <b>III.2. SPECIATION DU Cd DANS LES PARTIES AERIENNES D'<i>A. HALLERI</i> .....</b>	<b>231</b>
III.2.1. MATERIEL ET METHODES.....	231
III.2.1.1. Analyses EXAFS : préparation des échantillons et acquisition des données. ....	231
III.2.1.2. Analyses chimiques : détermination des concentrations en phytochélatines (PC) et glutathion (GSH).....	232
III.2.2. RESULTATS .....	235
III.2.2.1. Détermination de la spéciation moyenne du Cd : exploitation des spectres par combinaison linéaire. ....	235
III.2.2.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : exploitation des spectres par simulation numérique.....	242
III.2.2.3. Concentrations en phytochélatines et glutathion. ....	244
III.2.3. DISCUSSION .....	249

### CHAPITRE III : LOCALISATION ET SPECIATION DU CADMIUM DANS LES PARTIES AERIENNES D'*A. HALLERI*

Cette partie de l'étude vise à préciser les mécanismes de stockage du cadmium dans les parties aériennes de la plante hyperaccumulatrice *A. halleri* à l'échelle macroscopique, microscopique et moléculaire. On aborde en particulier la distribution du Cd au sein de la rosette et de la feuille, et les différents ligands possibles (acides organiques, acides aminés et PC) et la compétition entre différents polluants métalliques, en particulier le Zn dont la concentration est en général 10 à 100 fois plus élevée que le Cd, et qui est également hyperaccumulé par *A. halleri*. Dans ce but, des expériences de culture d'*A. halleri* des deux origines (MET et N-MET) ont été menées en solutions hydroponiques pour diverses concentrations en Cd et Zn et différents temps de culture.

Nous avons, dans un premier temps, mesuré l'accumulation totale de Cd et Zn dans les parties aériennes d'*A. halleri*, puis étudié la localisation et la compartimentation du Cd à l'échelle de la rosette et de la feuille par autoradiographie en ajoutant un radiotraceur :  $^{109}\text{Cd}$  dans la solution hydroponique. L'influence de (i) l'origine de la plante (MET et N-MET), (ii) des concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique et (iii) du temps d'exposition (3 et 9 semaines) a été évaluée sur l'accumulation, la localisation et la compartimentation du Cd (Fig. III-0).

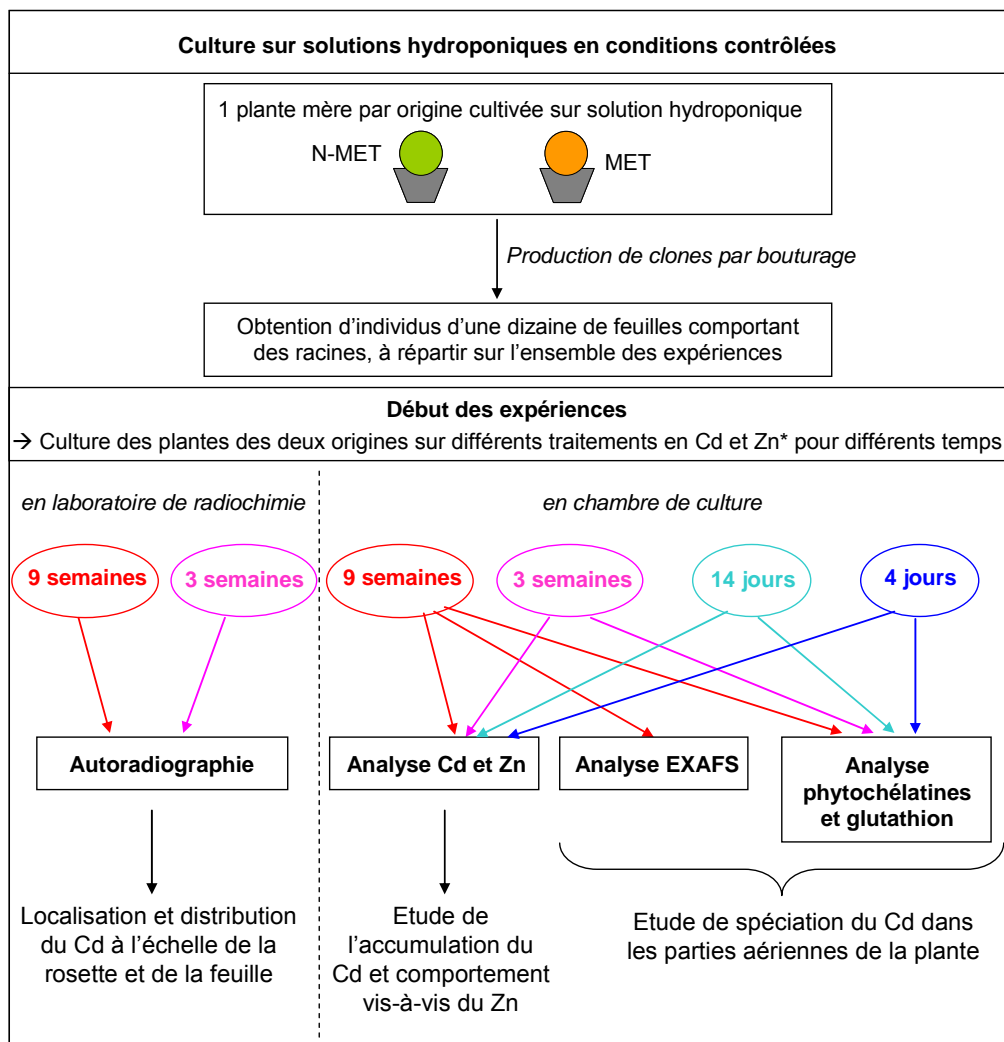
Dans un second temps nous avons cherché à déterminer la forme chimique du Cd dans les feuilles d'*A. halleri*. Pour cela, des spectres EXAFS ont été enregistrés au seuil K du Cd, sur des échantillons de feuilles d'*A. halleri* cultivées dans les mêmes conditions que pour l'étude menée en autoradiographie. Puis, sur ces mêmes échantillons de plante, nous avons mesuré dans les parties aériennes les phytochélatines et le glutathion, molécules probablement impliquées dans la complexation du Cd. Là encore, l'influence de (i) l'origine de la plante (MET et N-MET), (ii) des concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique et (iii) du temps d'exposition (3 et 9 semaines, et 4 et 14 jours pour les mesures de phytochélatines et glutathion) a été évaluée sur la spéciation du Cd (Fig. III-0).

Les plantes proviennent, pour chaque origine, d'une plante « mère », à savoir *A. halleri* CH2-1 pour l'origine MET (déjà étudiée en génétique notamment par le laboratoire

GEPV de Lille 1) et, pour l'origine N-MET, d'une plante obtenue à partir d'une graine collectée sur une population N-MET dans le massif des Hautes Fagnes (Be).

Les clones des deux origines ont été cultivés pendant 4 semaines sur une solution nutritive non contaminée, puis transférés sur des solutions contenant des concentrations variables en Cd et Zn. Des clones de contrôle ont aussi été cultivés sur solution hydroponique sans Cd contenant 30µM de Zn. Les clones ont été cultivés pour des périodes dites « longues » (3 et 9 semaines) et « courtes » (4 et 14 jours). Pour réduire la variabilité individuelle entre les plantes de la même origine, nous avons préparé et travaillé d'une part avec des clones et d'autres part avec des triplicats (3 replicats par conditions). Pour toutes les cultures, un suivi régulier de la croissance racinaire et de l'aspect des plantes a été réalisé afin d'estimer l'état de santé des plantes et voir si elles se développent sur les différentes solutions de culture.

Ce chapitre s'articule donc en trois parties. Tout d'abord nous aborderons la localisation du Cd chez *A. halleri*. Cette première partie fait l'objet d'un projet d'article, elle est rédigée en anglais et construite sur le plan d'un article (au format requis avant soumission – supply information en Annexe). La deuxième partie traite de la spéciation du Cd dans les parties aériennes de *A. halleri*. Dans un premier temps, le matériel et les méthodes utilisés pour déterminer la spéciation du Cd seront détaillés. Ensuite, les résultats obtenus en EXAFS, puis ceux des dosages des phytochélatines et glutathion seront exposés. Cette partie se terminera par une discussion sur la spéciation du Cd chez *A. halleri*.



\* Les traitements en Cd et Zn sont des solutions hydroponiques présentant des concentrations de 0, 5 ou 20  $\mu\text{M}$  de Cd et 30 ou 300  $\mu\text{M}$  de Zn.

Figure III-0: Schéma récapitulatif des expériences et analyses réalisées. Chaque analyse est faite en triplicat dans la mesure du possible, excepté pour l'étude de spéciation.

### III.1. Localisation du Cd dans *A. halleri*

#### **Cd localization and compartmentalization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* studied by autoradiography.**

Stéphanie Huguet <sup>1, 2, 3</sup>, Valérie Bert <sup>2</sup>, Agnès Laboudigue <sup>3</sup>, Véronique Barthès <sup>4</sup>, Marie-Pierre Isaure <sup>1\*</sup> and Géraldine Sarret <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Environmental Geochemistry Group, LGIT, Maison des Géosciences, University of Grenoble and CNRS, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France  
tel: 33 4 76 63 51 70, fax: 33 4 76 63 52 52, email: [shuguet@obs.ujf-grenoble.fr](mailto:shuguet@obs.ujf-grenoble.fr)

<sup>2</sup> Clean and Sustainable Technologies and Processes Unit, INERIS, Parc Technologique Alata, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>3</sup> Ecole des Mines de Douai, Civil and Environmental Engineering Department, 941 rue Charles Bourseul, BP 10838, 59508 Douai cedex, France

<sup>4</sup> CEA/LITEN/DTNM/L2T, CEA Grenoble, Av des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France

\* Present address: Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux (IPREM-UMR 5254), Université de Pau et des Pays de l'Adour, Hélioparc, 2 Av. Pierre Angot, 64053 PAU Cedex 9, France.

### III.1.1. Abstract

Mechanisms of Cd accumulation in the Zn and Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* are still poorly known. In this study, the total accumulation of Cd and Zn in the aerial parts of *A. halleri* was determined, and the localization and compartmentalization of Cd at the rosette and leaf scale was studied by autoradiography using  $^{109}\text{Cd}$ . The influence of (i) the plant origin (metallicolous vs non metallicolous), (ii) Cd and Zn concentrations in hydroponic solution, and (iii) exposure time (3 and 9 weeks) was assessed on Cd accumulation, localization and compartmentalization. The origin of the plant did not influence Cd and Zn accumulation. The highest Cd accumulation was found at 9-week exposure when plants were exposed to the highest concentration of Cd in solution. The nature of the treatment did not influence Cd localization and compartmentalization, and there were only slight differences as a function of the plant origin. There was no preferential accumulation in young or in senescent leaves for all plants. Cd was mainly stored in the leaf tissue, with an enrichment of peripheral tissues after 9-week exposure. Trichomes were enriched in Cd, but these cells represented a minor Cd storage site in *A. halleri*. This study shows the interest of autoradiography not only to image metal distribution in the aerial parts of a plant, but also to quantify its distribution between different regions or compartments.

#### Key Words:

Cadmium (Cd); *Arabidopsis halleri*; hyperaccumulation; Cd localization; Cd compartmentalization;  $^{109}\text{Cd}$  autoradiography; Zinc (Zn).

### III.1.2. Introduction

Recently, great attention has been given to the Zn and Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. This species is present in metal-contaminated and non-contaminated soils of Europe. It is constitutively Zn-tolerant and Zn-hyperaccumulator, although displaying minor quantitative variations in Zn tolerance depending on its origin (Pauwels *et al.*, 2006). *A. halleri* is also constitutively Cd tolerant, and its ability to accumulate Cd is variable between populations and within a given population (Bert *et al.*, 2002). Although *A. halleri* can accumulate up to 6000 mg kg<sup>-1</sup> DW Cd when grown

in hydroponic solution (Küpper *et al.*, 2000), plants collected in their natural habitat in Europe do not systematically reach the 100 mg kg<sup>-1</sup> DW threshold value used to define Cd hyperaccumulation (Baker and Brooks, 1989, Wenzel and Jockwer, 1999, Bert *et al.*, 2002). In the perspective of using metal hyperaccumulating plants for phytoextraction, *A. halleri* has less potential than the Zn, Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* which accumulates higher Cd concentrations (Bert *et al.*, 2002, McGrath *et al.*, 2006). However, *A. halleri* receives more and more attention and is considered an appropriate model plant for studying metal tolerance and hyperaccumulation for several reasons (Bert *et al.*, 2003, Roosens *et al.*, 2008). Firstly, it is phylogenetically close to the well studied model species *A. thaliana*. Secondly, it has a widespread distribution in Europe and it is present in contaminated and non contaminated areas (Bert *et al.*, 2000, 2002). Recent progresses have enabled a better understanding of the origin and evolutionary dynamics of Zn tolerance and accumulation, the identification of genes potentially involved in Zn tolerance and accumulation, and the identification of Quantitative Trait Loci (QTL) involved in Zn tolerance (Roosens *et al.*, 2008, Verbruggen *et al.*, 2009). Recently, Hanikenne *et al.* (2008) pointed the prominent role of the metal transporter HMA4 in Zn tolerance and hyperaccumulation. The localization and speciation of Zn in the leaves of *A. halleri* were also determined. This metal is mostly accumulated in the vacuoles of mesophyll cells (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000), and Zn malate was the major chemical form identified (Sarret *et al.*, 2002). Concerning cadmium in *A. halleri*, recent studies were focused on genes potentially involved in Cd tolerance and accumulation (Craciun *et al.*, 2006, Weber *et al.*, 2006), on QTLs for Cd tolerance (Courbot *et al.*, 2007), on Cd localization in the leaves (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000, Hokura *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2008), on Cd speciation in the xylem sap (Ueno *et al.*, 2008), and on the physiology of Cd tolerance and accumulation (Zhao *et al.*, 2006). In leaves, Cd is accumulated preferentially in mesophyll cells (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000). The vacuolar localization of Cd has not been formally evidenced, and Cd speciation in the leaves is not known. The base of the trichomes (epidermal hairs present on the leaf surface) is enriched in metals including Zn (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000), Cd (Hokura *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2008) and other metals (Sarret *et al.*, 2002) depending on the culture medium.

The localization of metals in plants at the sub-cellular level is generally studied by transmission electron microscopy coupled with X-ray microanalysis (TEM-EDX).



The cellular level and the tissues can be studied by scanning electron microscopy coupled with X-ray microanalysis (SEM-EDX), micro-particle-induced X-ray emission (PIXE), or micro-synchrotron radiation X-ray fluorescence ( $\mu$ SXRF). These latter techniques enable the chemical mapping of a zone of a few square cm (e.g., a single leaf) within a reasonable acquisition time (i.e. a few hours). Confocal laser scanning microscopy (CLSM) or epifluorescence microscopy using fluorescent metal-specific dyes (e.g. Zinquin and Zinpyr for Zn) can also be used to localize metals at the cellular scale (Sarret *et al.*, 2006, Peng *et al.*, 2007, Sinclair *et al.*, 2007, Hanikenne *et al.*, 2008). Autoradiography offers a complementary approach since it allows the localization of metals at the scale of the whole plant (Crafts and Yamaguchi, 1964, Cunningham *et al.*, 1975, Cosio *et al.*, 2005, Cosio *et al.*, 2006, Page *et al.*, 2006) with a resolution of a few tens of micrometers. The technique is more sensitive than previously cited ones, and enables the study of plants at low metal exposure. For instance, Cosio *et al.* (2005) were able to image the distribution of Cd in *Thlaspi caerulescens* grown for 30 days in  $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M } ^{109}\text{Cd}$ . They found that Cd was mainly accumulated at the edges of the leaves and in necrotic spots. To our knowledge, there are no equivalent studies conducted on *A. halleri*.

The purpose of this study was to determine Cd accumulation in aerial parts of *A. halleri*, Cd localization at the rosette scale (i.e. between young, mature and senescent leaves) and at the leaf scale. Autoradiography was used not only to localize Cd enrichments at these two scales, but also to determine the compartmentalization of the metal within selected regions of the leaves. Previous studies on Cd localization in *A. halleri* leaves were all done on plants of metallicolous origin (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000, Hokura *et al.*, 2006, Fukuda *et al.*, 2008). Considering the variation of Cd accumulation depending on the plant origin (Bert *et al.*, 2002), the first objective of this study was to compare *A. halleri* from a metallicolous and non metallicolous origin. The plants were grown in hydroponics under controlled conditions because the obtained data are inherently more reproducible than those in soils (Robinson *et al.*, 1998). Moreover, for each origin, a cloned plant was used in order to remove the variability between individuals. A second objective of this study was to test the influence of Zn on Cd accumulation and localization. Finally, the effect of the metal exposure time was tested by comparing plants after 3-week and 9-week exposure.

### III.1.3. Materials and Methods

#### III.1.3.1. Plant material and culture

*Arabidopsis halleri* from metalicolous (MET, originating from Aubry, France) and non metalicolous (N-MET, originating from Hautes Fagnes, Belgium) origins were compared in this study. For the Aubry origin, we used a clone provided by P. Saumitou-Laprade and studied in previous works (Sarret *et al.*, 2002, Courbot *et al.*, 2007, Willems *et al.*, 2007). For the Haute Fagnes origin, seeds were collected on site and germinated on filter papers moistened with deionized water. Seedlings were transferred to pots filled with compost for 1 month to obtain mature plants. One plant was chosen for cloning. Both origins were cloned in parallel in compost. Generally, clones comprised a minimum of ten leaves of any age at the beginning of the metal exposure. For both origins, clones were transferred to 1.0 L pots (3 clones per pot) filled with a basal nutrient solution adapted from Schat *et al.* (1996) and placed in a controlled environment growth room (12h photo period, 20/16°C day/night temperature; 80% relative humidity). This basal nutrient solution contained 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O; 1 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O; 3mM KNO<sub>3</sub>; 0.1 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, H<sub>2</sub>O; 0.1 μM CuSO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O; 25 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 2 μM MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O; 1 μM KCl; 0.1 μM NaCl; 30 μM ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O and 20 μM Fe(III)-EDDHA. The nutrient solution was renewed every week and aerated continuously. After three weeks, clones were used in two parallel experiments, one to quantify Cd accumulation in leaves using stable Cd and one to localize Cd distribution at the rosette scale by autoradiography using <sup>109</sup>Cd.

Clones were transferred to the nutrient solution added with 0 (control), 5 or 20 μM CdCl<sub>2</sub> and 30 (control) or 300 μM ZnSO<sub>4</sub> and grown for 3 or 9 weeks in the controlled environment growth room (same conditions as above). Firstly, Cd and Zn tested concentrations were chosen according to Cd and Zn concentrations used by others authors for the same kind of experiments. The highest Zn concentration was set as an order of magnitude higher than that of Cd according to Zn/Cd ratios generally found in contaminated soils. For this experiment, metal concentrations in the nutrient solution are expressed as C<sub>x/y</sub>, where x and y are the Cd and Zn concentrations, respectively (x = 0, 5 or 20 and y = 30 or 300). C<sub>0/30</sub> is the control treatment. Three clones per condition were

grown in the same 1 L pot, the solutions were renewed every week and aerated continuously (see below design of experiment in Table 1).

#### **III.1.3.2. Root growth assessment and plant aspect**

The relative root elongation (R), defined as the difference between the final and initial length of the longest root, was determined for the three clones for each treatment (Table 2). In addition, the appearance of the plant was examined at the end of growth time and compared with control plants. In particular foliar symptoms such as curling or rolling leaves, colour changes, violet stems, leaf veins and leaves, overall stunting, appearance of necrosis and leaf death were followed (Table 2).

#### **III.1.3.3. Zn and Cd accumulation in aerial parts of plants**

After an exposure of 3 or 9 weeks, aboveground parts were harvested, dried at 60°C until constant weight and ground. Aliquots of 100 mg of plant material were then digested in 2 mL of a 1:4 (v/v) mixture of 37% (v/v) HCl and 65% (v/v) HNO<sub>3</sub>, in closed Teflon® cylinders for 7 hours at 140°C. Total Cd and Zn concentrations in digests were measured after dilution using a flame Atomic Absorption Spectrophotometer, AAS (Perkin Elmer 2100).

#### **III.1.3.4. Cd localization and compartmentalization in aerial parts of plants**

Clones were transferred in pots (300 mL) filled with the nutrient solution added with 20  $\mu\text{Ci L}^{-1}$  <sup>109</sup>Cd (740 kBq), 5 or 20  $\mu\text{M}$  CdCl<sub>2</sub> and 30 or 300  $\mu\text{M}$  ZnSO<sub>4</sub> (Table 1). For this experiment, metal concentrations in the nutrient solution are expressed as \*C<sub>x/y</sub>, where x and y are the Cd and Zn concentrations, respectively (x = 0, 5 or 20 and y = 30 or 300). Plants were grown for 3 and 9 weeks in a 50 cm (L) × 30 cm (W) × 20 cm (D) mini-greenhouse made of Plexiglas, placed in an air-conditioned radiochemistry laboratory, where room temperature was set to 21°C. In the mini-greenhouse, plants grew at 20 ± 2°C, under natural light with 90 ± 5 % relative humidity. The solutions were replaced every week and aerated continuously by air bubbling.

Only one clone per origin and per condition was used for the 3-week exposure, and 2 MET clones and 1 N-MET clone were used for the 9-week exposure according to the limited space available in the mini-greenhouse and in the radiochemistry laboratory (Table 1). At the end of the exposure time, aboveground parts of plants were cut and arranged as flat as possible on a paper sheet, covered with a polyethylene sheet, and placed on SR autoradiography films (Packard) for 15h (adaxial side of the leaves against the film). Films were then developed using a Cyclone Storage Phosphor System (Perkin Elmer). The autoradiographs obtained were then treated using ImageJ and OptiQuant® (Perkin Elmer) softwares. ImageJ was used to calculate the surface of selected regions of the rosette. OptiQuant® was used to quantify the total radioactive intensity ( $DLU_{tot}$ ) expressed in digital light units (arbitrary units) and the radioactive intensity per surface unit ( $DLU\text{ mm}^{-2}$ ). Standard containing  $^{14}\text{C}$  were placed beside each plant sample on autoradiography films in order to intercalibrate the intensities of the autoradiographs. In addition, autoradiographs were normalized based on the  $^{109}\text{Cd}/\text{Cd}$  ratio present in the hydroponic solution. This ratio varied by a factor of four between the solutions containing 5 and 20  $\mu\text{M}$  Cd since the activity was identical for all conditions (20  $\mu\text{Ci l}^{-1}$ , i.e. molar activity of  $76\cdot 10^{-3}\text{ }\mu\text{M l}^{-1}\text{ }^{109}\text{Cd}$ ). Thus, all images presented in this study can be directly compared in terms of grey scale. In the absence of standard material of known  $^{109}\text{Cd}$  content, the radioactive intensities could not be converted into actual Cd concentrations in leaves.

The depth of analysis of  $^{109}\text{Cd}$  autoradiography on leaves is difficult to estimate because several types of radiations are emitted by the sample and impress the autoradiography films.  $^{109}\text{Cd}$  emits X-rays at 22.1 keV (54.5% of total radiation), 21.9 keV (28.9%) and 24.9 keV (13.7%) and gamma rays at 88.0 keV (3.6 %). These high energy radiations induce secondary excitations in the leaves and the emission of lower energy X-rays and of electrons. The fact that the autoradiographs recorded on the adaxial and abaxial side of a given leaf of *T. caerulea* are different (Cosio *et al.*, 2005) and that the intensity of the signal strongly depends on how the leaf is flattened in the film (see below) strongly suggests that the majority of the signal arises from secondary excitations. The depth of analysis of  $^{109}\text{Cd}$  autoradiography on these samples is estimated to less than 100  $\mu\text{m}$ . *A. halleri* has thin leaves (a few hundreds of  $\mu\text{m}$  for the mature leaves), with relatively few layers of cells (typically one layer of palisade and three to four layers of spongy mesophyll). In addition, both the upper and lower epidermal cells are very small in size (Zhao *et al.*, 2000) with a length of 8-30  $\mu\text{m}$

(Broadley *et al.*, 2007). Therefore, it is likely that  $^{109}\text{Cd}$  autoradiography reaches the mesophyll.

For each plant,  $\text{DLU}_{\text{tot}}$  was measured. Then, one to three mature leaves representative in terms of overall intensity and distribution of activity were selected (Table 1). The term “mature” was defined by a width higher than 10 mm. Conversely “young” leaves were defined by a width lower than 10 mm. The  $\text{DLU}_{\text{tot}}$  and  $\text{DLU mm}^{-2}$  were determined for the whole leaf and for selected leaf compartments. For the 3-week exposure plants, these compartments included (i) petiole + central vein, (ii) tissue and (iii) trichomes. It was difficult to separate visually the petiole and the central vein, so these two compartments were merged. For this latter compartment, the  $\text{DLU}_{\text{tot}}$  was obtained directly by OptiQuant® (Fig. 1A, 1B). For the “Trichomes”, the  $\text{DLU mm}^{-2}_{\text{Trich}}$  was obtained by averaging measurements on ten trichomes of the leaf, randomly chosen.  $\text{DLU}_{\text{tot Trich}}$  was then obtained by the following calculation:

$$(1) \quad \text{DLU}_{\text{tot Trich}} = (\text{DLU mm}^{-2}_{\text{Trich}}) (N_{\text{Trich}}) (A_{\text{Trich}})$$

where  $N_{\text{Trich}}$  is the number of trichomes in the leaf, and  $A_{\text{Trich}}$  is the mean surface of the black spots corresponding to the trichomes. For the tissue, the  $\text{DLU mm}^{-2}_{\text{Tissue}}$  was obtained by averaging measurements on five representative areas (i.e. zones devoid of visible trichomes on autoradiographs, rectangles in Fig. 1A), and  $\text{DLU}_{\text{tot Tissue}}$  was calculated by difference as follows:

$$(2) \quad \text{DLU}_{\text{tot Tissue}} = (\text{DLU}_{\text{tot Leaf}}) - (\text{DLU}_{\text{tot “P+ CV”}}) - (\text{DLU}_{\text{tot Trich}})$$

where  $\text{DLU}_{\text{tot Leaf}}$ ,  $\text{DLU}_{\text{tot “P+ CV”}}$ , and  $\text{DLU}_{\text{tot Trich}}$  are the total activities for the leaf, petiole + central vein and trichomes, respectively. The  $\text{DLU mm}^{-2}$  were used to compare  $^{109}\text{Cd}$  activities in the various compartments, and the  $\text{DLU}_{\text{tot}}$  were used to calculate the contribution of each compartment to the total activity of the leaf.

For 9-week exposure plants, the trichomes were in some cases hardly visible on the autoradiographs, and the peripheral part of the leaves showed an enhanced activity. Therefore, the compartments defined for these plants were “Petiole + Central vein”, “Peripheral tissue” and “Tissue”, the latter corresponding to non-peripheral tissue. Both categories of tissue included the trichomes since no specific compartment for trichomes was defined. The  $\text{DLU mm}^{-2}_{\text{Tissue}}$  and  $\text{DLU mm}^{-2}_{\text{Periph Tissue}}$  were obtained by averaging measurements on five representative areas (fig. 1B). The  $\text{DLU}_{\text{tot Tissue}}$  was obtained as follows:

$$(3) \quad \text{DLU}_{\text{tot Tissue}} = (\text{DLU}_{\text{tot Leaf}}) - (\text{DLU}_{\text{tot P+ CV}}) - (\text{DLU}_{\text{tot Periph Tissue}})$$

### III.1.3.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the statistical program SPSS 15.0 (2007). One-way and three-way ANOVA followed by a post hoc comparison (Tukey's test) were performed on the data set.

### III.1.4. Results

#### III.1.4.1. Assessment of root growth and plant aspect

Plant tolerance to Cd and Zn concentrations was assessed by measuring the relative root elongation and by looking at the plant aspect (Table 2). Results showed that for both origins and whatever the treatment, all relative root elongations were positive which means that roots of all plants grew during the experiment. MET and N-MET plants showed different phenotypes. In the control, N-MET plants presented more rolling and reddish leaves than MET plants (Table 2 and Figure SI 1). For the Zn-only treatment ( $C_{0/300}$ ) no change in the general aspect of plants relative to the control was observed. This is consistent with the constitutive Zn tolerance of *A. halleri*. A violet coloration of the underside of the leaves was observed after 9 weeks of exposure to  $C_{5/30}$  and  $C_{5/300}$  treatments for MET plants, and to  $C_{5/30}$  treatment for N-MET plants (Tab. 2). For the  $C_{20/30}$  and  $C_{20/300}$  treatments, N-MET plants and to a lesser extent MET plants showed more rolling and/or violet leaves than control plants. In addition, N-MET plants presented stronger reddish leaves at  $C_{20/30}$ . These observations suggest a higher sensitivity of N-MET plants to the metal treatments. For all treatments tested, no obvious signs of toxicity such as necrosis or chlorosis were observed. In summary, for both origins, visible toxicity signs were limited except for the 9-week exposure to  $C_{20/30}$ .

#### III.1.4.2. Cd and Zn concentrations in aerial parts of plants

Figure 2 reports Zn and Cd concentrations in aerial plant parts of MET and N-MET *A. halleri* cultivated for 3 and 9 weeks in presence of various Cd and Zn concentrations. A 3-way ANOVA was performed on Zn and Cd concentrations in aerial parts in order to test possible effects of 3 factors including the plant origin, the Cd and

Zn concentrations in hydroponic solution and the exposure time. Results of the ANOVA showed that the content of metals concentrations in aerial parts was not affected by the plant origin ( $P>0.05$ ), but was affected by the exposure time and by the nature of the treatment ( $P<0.05$ ).

Zn and Cd concentrations in aerial parts were examined more precisely by performing 1-way ANOVA separately on each origin and each exposure time (Fig. 2). The highest Zn concentrations were measured in aerial parts of plants cultivated for 9 weeks for MET plants in the presence of 20  $\mu\text{M}$  Cd and 300  $\mu\text{M}$  Zn with maximal concentrations reaching  $161.1 \pm 7.9 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$  (Fig. 2A). For N-MET plants maximal Zn concentrations ( $117.1 \pm 43.0$  and  $179.6 \pm 61.1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$ ) were measured in the presence of 300  $\mu\text{M}$  Zn and 5 and 20  $\mu\text{M}$  Cd respectively (Fig. 2B). For Cd concentrations in aerial parts, results of the 1-way ANOVA showed that, for MET and N-MET plants, the highest Cd concentrations were measured in plants cultivated for 9 weeks in presence of 20  $\mu\text{M}$  Cd (Fig. 2C, 2D): Cd concentrations reached up to  $9.5 \pm 0.2$  and  $8.7 \pm 0.7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$  for MET plants and  $8.0 \pm 1.5$  and  $7.8 \pm 0.1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ DW}$  for N-MET plants, for  $C_{20/300}$  and  $C_{20/30}$  treatments respectively (Fig. 2C, 2D). Furthermore, Zn content in hydroponic solution did not seem to affect the Cd concentration in aerial parts of plants at 20 $\mu\text{M}$  Cd in solution (Fig. 2C, 2D). A weak competition effect was observed only for MET plants exposed to 5 $\mu\text{M}$  Cd in solution for 9 weeks (Fig. 2C).

#### **III.1.4.3. Comparison of Cd accumulation and radioactive intensity**

The localization of Cd in plants exposed to the same  $C_{x/y}$  conditions was then studied by autoradiography. The radioactive intensity per unit of surface (in  $\text{DLU mm}^{-2}$ ) was measured on whole rosettes and compared to Cd concentrations measured in the aerial parts by AAS in the Cd accumulation experiment described above (Fig. 3). A significant correlation was found between the two measurements ( $R= 0.77$ ,  $P< 0.01$ ). Despite slightly different culture conditions, Cd accumulation followed the same trends in both experiments.

#### III.1.4.4. Localization of Cd at the rosette scale

The localization of Cd was first studied at the scale of the rosette. Figure 4A-C shows the photograph and autoradiograph for a MET plant exposed to  $^{109}\text{Cd}_{20/30}$  during 3 weeks. Dark regions on the autoradiograph correspond to Cd-enriched zones. Leaves were heterogeneous in terms of overall intensity (Fig. 4B), and there was no apparent relationship between the size of the leaves and their radioactive intensity. Thus, Cd did not accumulate preferentially in young or in mature leaves. The same observations applied to the MET and N-MET plants exposed for 3 weeks to other treatments (Fig. SI 2). The petiole and the central vein were the most Cd-enriched regions. Trichomes appeared as black spots in the autoradiographs (Fig. 4C), which means that they were enriched in Cd compared to the underlying tissue. The leaf tissue produced a more diffuse signal. The same observations applied to the MET and N-MET plants exposed for 3 weeks to other treatments (SI 2), except some of them (e.g., N-MET plant exposed to  $^{109}\text{Cd}_{5/30}$ ) for which the highest intensity was observed in the tissue of some leaves. Note that some young leaves placed close to the center of the rosette were difficult to flatten correctly on the autoradiographic film, which led to a loss of resolution and intensity for the smallest ones.

The autoradiograph of the MET plant after 9 weeks of exposure to  $^{109}\text{Cd}_{20/30}$  was darker than after 3 weeks (Fig. 4E). This was consistent with the increased Cd content measured in the Cd accumulation experiment. The mature leaves were darker than the young ones and relatively homogeneous in terms of radioactive intensity, whereas young leaves still presented a variety of intensities. In mature leaves, the darkest regions were the petiole (and to a lesser extent the central vein) and the edge of the leaves (Fig. 4F). This latter observation was not due to a curling of the edge of the leaves. Only a few dark spots corresponding to trichomes were observed, although trichomes were still present on the leaves. This latter observation was probably due to a lower contrast between the signal of the trichomes and of the underlying leaf tissue, as compared to what was found for the 3-week exposure. Similar Cd distributions within the rosette and within mature leaves were observed on the MET and N-MET plants exposed for 9 weeks to other treatments (Fig. SI 2).

Some plants showed a few yellowish and/or dry leaves, regardless of their origin and metal exposure conditions. These leaves, considered as senescent, were not enriched in Cd (Fig. 5) compared to non senescent leaves.



#### III.1.4.5. Cd compartmentalization at leaf scale

The compartmentalization of Cd was then investigated at the leaf scale on mature leaves. For the 3-week exposure plant, three compartments were defined including “Petiole + Central Vein”, “Tissue” and “Trichomes” (Fig. 1A). Figure 6 compares the radioactive intensities per unit of surface measured in the three compartments of a representative mature leaf of the MET origin after 3 and 9 weeks of exposure to  $^{*}C_{20/30}$ . After 3 weeks, the radioactive intensity per unit of surface decreased in the order “Petiole + Central Vein” > “Trichomes” > “Tissue”. The same order was obtained for all MET plants regardless of  $^{*}C_{x/y}$  treatments (Fig. SI 3). For N-MET plants, the “Trichomes” compartment was the most concentrated, followed by “Petiole + Central Vein” and then “Tissue”, except for the plant exposed to  $^{*}C_{5/300}$  in which trichomes were not observed (Fig. SI 3). For the 9-week exposure plants, different compartments were defined to take into account the changes in Cd localization. These compartments included “Petiole + Central Vein”, “Peripheral Tissue” and “Tissue” (Fig. 1B). Since trichomes were barely visible on the autoradiographs, especially for MET plants (Fig. 6D), no “Trichomes” compartment was defined. Therefore, the contribution of trichomes was contained in the “Peripheral Tissue” and “Tissue” compartments. For both origins and for all treatments, the radioactive intensity per unit of surface decreased in the order “Peripheral Tissue” > “Petiole + Central Vein” > “Tissue” (Fig. 6B and Fig. SI3).

The radioactive intensities measured in the «Petiole + Central Vein» compartment increased from  $2.9 \cdot 10^6$  to  $4.4 \cdot 10^6$  DLU mm<sup>-2</sup> between 3 and 9 weeks (Fig. 6A-B). The same increase was observed for the “Tissue” compartment with intensities of  $0.8 \pm 0.2 \cdot 10^6$  and  $3.0 \pm 0.4 \cdot 10^6$  DLU mm<sup>-2</sup> at 3 and 9 weeks of exposure, respectively, and  $8.2 \pm 0.9 \cdot 10^6$  DLU mm<sup>-2</sup> for the peripheral tissue. It can be noticed that the intensities measured in the “Tissue” and “Peripheral Tissue” are higher than the one of the trichomes after 3 weeks of exposure. Thus, the fact that most trichomes were no longer after 9 weeks could be due to a faster increase in Cd content in the leaf tissue compared to the trichomes, leading to a lower contrast in Cd content between these two compartments.

The surface of each compartment was then determined. The “Tissue” was the larger compartment ( $84.3 \pm 2.5$  % and  $84.5 \pm 2.1$  % of the leaf surface for MET and N-

MET, respectively,  $n = 4$ ), followed by the « Petiole + Central Vein » ( $14.5 \pm 3.1$  % and  $12.5 \pm 0.6$  %, respectively), and “Trichomes” ( $1.2 \pm 0.7$  % and  $4.0 \pm 1.1$  %, respectively). The “Trichomes” compartment was higher for N-MET plants because they were more hairy than MET plants (SI 4). The proportion of Cd in each compartment was then calculated by multiplying the DLUs  $\text{mm}^{-2}$  by the surface of each compartment (Table 3). After 3 weeks of exposure, the “Tissue” was the major Cd accumulation compartment for both origins and all treatments, although it was the least concentrated (see above). It contained up to  $72 \pm 14$  % Cd for MET plants and  $88 \pm 17$  % for N-MET plants (Table 3). Thus, the total amount of Cd in each compartment is primarily determined by its surface rather than by its Cd local concentration. The “Petiole + Central Vein” compartment contained 12 to 43 % Cd, and the “Trichomes” was the minor compartment with  $1.0 \pm 0.2$  to  $15 \pm 5$  % Cd. This order was valid for both origins, despite the higher density of trichomes of the N-MET plants (SI 4), and for all treatments. After 9 weeks of exposure, for  $*C_{5/30}$  and  $*C_{5/300}$  conditions Cd was predominantly stored in “Tissue” compartment in MET plants and in “Peripheral Tissue” in N-MET plants. For  $*C_{20/30}$  and  $*C_{20/300}$  conditions, the “Tissue” and “Peripheral Tissue” were the major compartments for origins, with roughly the same quantity of Cd in each of them.

### III.1.5. Discussion

#### III.1.5.1. Zn and Cd accumulation

Results showed that whatever the Cd and Zn treatments and whatever the exposure time to these treatments, the plant origin has no significant effect on Zn or on Cd concentrations measured in aerial parts of *A. halleri*. Concerning Zn, Bert *et al.*, (2000) showed that *A. halleri* from non metalicolous origin exhibited a higher Zn accumulation rate than that from metalicolous origin. The same observation was reported for *Thlaspi caerulescens* (Lloyd-Thomas, 1995, Meerts and Van Isacker, 1997, Lombi *et al.*, 2000), with a three-fold higher Zn accumulation in the plants from uncontaminated origin (Meerts and Van Isacker, 1997). Another study conducted by Bert *et al.* (2002) on 33 populations of *A. halleri* highlighted a relatively homogeneous

Zn accumulation response for plants from various populations of a given type (MET or N-MET) and within each population.

Concerning Cd, Bert *et al.* (2002) showed variable accumulation ability between and within populations. For example, for *A. halleri* plants collected in a contaminated site in Germany, the Cd content was from 42 to 136  $\mu\text{g g}^{-1}$  DW in their aerial parts. Thus, the absence of significant difference in Cd and Zn accumulation between MET and N-MET origin could be due to the fact that the experiment was conducted on only one individual per origin, chosen randomly. For Zn, the N-MET individual picked for this study may be in the lower hand in terms of Zn accumulation in its population, and the MET individual in the higher hand.

Zhao *et al.* (2006) studied Cd and Zn accumulation in aerial parts of *A. halleri* plants from a metalicolous origin after a 3-week exposure to either 5  $\mu\text{M}$  Cd and various Zn concentrations (1, 5, 50 and 500  $\mu\text{M}$ ), or 5  $\mu\text{M}$  Zn and various Cd concentrations (5, 15, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ). Let's compare the results obtained in this study for MET plants exposed to 5  $\mu\text{M}$  Cd and 30 or 300  $\mu\text{M}$  Zn for 3 weeks with results from closest treatments, i.e. 5  $\mu\text{M}$  Cd and 50 or 500  $\mu\text{M}$  Zn (Zhao *et al.*, (2006). Zn accumulations were in the same order of magnitude ( $33 \pm 6 \mu\text{mol g}^{-1}$  DW (this study) and  $\approx 30 \mu\text{mol g}^{-1}$  DW (Zhao *et al.*, 2006) at 30 and 50  $\mu\text{M}$  Zn respectively; and  $53 \pm 8 \mu\text{mol g}^{-1}$  DW (this study) and  $\approx 100 \mu\text{mol g}^{-1}$  DW (Zhao *et al.*, 2006) at 300 and 500  $\mu\text{M}$  Zn respectively). MET-plants studied in (Zhao *et al.*, 2006) accumulated slightly more Cd than in this study ( $\approx 6$  and  $2.2 \pm 1.3 \mu\text{mol g}^{-1}$  DW, respectively).

The present study showed an effect of the exposure time, with highest Cd and Zn concentrations at 9-weeks. Thus, Zn and Cd contents do not reach steady state after 3 weeks but increase between 3 and 9 weeks. It would be interesting to test whether Zn and Cd contents reach a plateau after a certain exposure time.

Zn content in hydroponic solution did not affect the Cd concentration in aerial plant parts, except in one case. A slight competition effect was observed for MET plants after 9-week exposure to the  $\text{C}_{5/300}$  treatment. Several studies on *A. halleri* evidenced a competition effect between Cd and Zn uptake. Zhao *et al.* (2006) reported that after 3-week exposure to 5  $\mu\text{M}$  Cd and various Zn concentrations (1, 5, 50 and 500  $\mu\text{M}$ ), Cd concentrations in shoots were decreased significantly by increasing Zn concentration in the solution. Conversely, Zn concentrations in shoots increased with increasing Zn in the solution. In another study, where *A. halleri* plants from a metalicolous origin were

exposed for 14 weeks to 100  $\mu\text{M}$  Cd and 5 or 500  $\mu\text{M}$  Zn, Küpper *et al.* (2000) found a reduced Cd uptake with increased levels of Zn. More recently, Ueno *et al.* (2008) suggested that Cd transfer to the xylem in *A. halleri* was partly shared with Zn, as Cd concentration in the xylem sap was decreased by increasing the concentration of external Zn.

In the present study, the absence of Zn/Cd competition might be due to precipitation of Zn and/or Cd in the hydroponic solution. The measurement of  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  free ions could enable to check this hypothesis. Moreover, competition with other cations (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ) could mask the effect of Zn.

### **III.1.5.2. Cd localization and compartmentalization at plant and leaf scale.**

To learn more about the general Cd allocation in aerial parts of *A. halleri*, autoradiography experiments were performed to localize Cd accumulation regions at the rosette and leaf scales and to determine the distribution of Cd in these regions.

Whatever exposure time, there was no difference of localization and of Cd radioactive intensity as a function of the plant origin. In addition, Cd and Zn concentrations in solution did not influence the Cd allocation at the rosette and leaf scales, whereas they had an effect on intensities. Zn presence did not influence the Cd localization.

After 3-week exposure to Cd and Zn treatment, for both origins and whatever the treatment, the most Cd-enriched compartments could be ranked as follows: “Petiole and Central vein” > “Trichomes” > “Tissue”. After 9-week exposure, the order was “Peripheral Tissue” > “Petiole + Central Vein” > “Tissue”. A similar Cd accumulation at the edge of the leaves was observed by Cosio *et al.* (2005) in *Thlaspi caerulescens* after 30 days of exposure to 5, 10 and 50  $\mu\text{M}$  Cd. The quantification of Cd contained in each compartment showed that Cd is mainly stored in “Tissue” and “Peripheral Tissue” compartments. Indeed, 60 to 90% of leaf total Cd was stored in the “Tissue” after 3-week exposure time, and 65 to 90% was stored in the “Tissue” and “Peripheral Tissue” after 9-week exposure time, with equivalent amounts of Cd between the two compartments

Whatever Cd and Zn treatments, exposure times and plant origin, there was no preferential accumulation in young or mature leaves. On the contrary, Cd was accumulated preferentially in the youngest leaves of both *Brassica juncea* and *Thlaspi caerulescens* (Salt *et al.*, 1995). Cosio *et al.* (2005) reported no difference of Cd

localization in leaves of *T. caerulescens* as a function of exposure time (3, 15 and 30 days), but differences according to the Cd concentration in the nutrient solution. At low Cd exposure ( $2.2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ ), the metal was preferentially located in the younger leaves. At higher exposure ( $50 \mu\text{M Cd}$ ), Cd was located mainly in older leaves, and its distribution was highly uneven. Cd accumulation was localized in spots corresponding to necrotic zones. The authors suggested that the necrosis resulted directly from Cd toxicity. The same symptoms were observed in leaves of Indian mustard (Salt *et al.*, 1995). Dahmani-Muller *et al.* (2000) proposed that the fall of the metal-richest leaves was a detoxification strategy in the case of *A. maritima*. In the present study, the leaves of *A. halleri* did not present any necrotic spots, and Cd distribution in the leaf tissue was relatively homogeneous. Some plants showed a few yellowish and/or dry leaves, regardless of their origin and metal exposure conditions. These leaves, considered as senescent, were not enriched in Cd. Moreover, young leaves were not Cd-enriched. Thus the strategy of Cd detoxification in *A. halleri* does not rely on the sequestration in a category of leaves. All leaves are involved in Cd accumulation, and Cd detoxification more likely relies on cellular and subcellular compartmentalization in the leaf tissue. The Cd enrichment at the periphery of the leaves might be explained by an enhanced transpiration in this region, leading to an enhanced influx of xylem sap to compensate the loss of water. Salt *et al.* (1995) found a relationship between transpiration and Cd accumulation in *B. juncea*, and suggested that Cd accumulation in leaves was driven mainly by mass flow due to transpiration. A positive effect of transpiration on the uptake and translocation of others cations like including Na, Ca, B, Mn, Ca and Si was observed (Marschner, 1995). Moreover, higher concentrations of these elements were found in organs or in regions of the leaves showing higher transpiration rates (Marschner, 1995). Likewise, Shen and Ma (2001) reported a decrease in Al accumulation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench. cv. Jianxi) when the transpiration was limited, and a higher Al concentration at the margins than in the centre of the leaves. They concluded that Al distribution was controlled by transpiration (Shen and Ma, 2001).

A Cd-enrichment in the trichomes was clearly visible at 3-week exposure time, whereas they could hardly be distinguished among the tissues after 9 weeks, in particular for MET plants. Trichomes of *A. halleri* are unicellular epidermal hairs present at the surface of leaves. The sequestration of Cd in the trichomes could be a way to protect the metabolically active tissue cells from metals toxicity. The sequestration of

a variety of heavy metals was observed in the trichomes of both hyperaccumulating and non-accumulating species. Reports include, for instance, Ni in *Alyssum murale* (Broadhurst *et al.*, 2004), Pb, Zn and Cd in Indian mustard (Salt *et al.*, 1995), and in tobacco (Martell, 1974, Harada *et al.*, 2006, Sarret *et al.*, 2006, Harada and Choi, 2008). Hokura *et al.* (2006) found by  $\mu$ XRF that Cd was highly accumulated in the base of the bifurcation area of the trichomes of *A. halleri*. Zn was also observed at the base of the trichomes of *A. halleri* (Küpper *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2000, Sarret *et al.*, 2002). In the present study, MET plants have got less trichomes than N-MET plants. In *A. thaliana*, Isaure *et al.* (2006) suggested that trichomes were the major compartment of Cd accumulation in the leaves. In addition, a previous study on *A. lyrata* by  $^{109}\text{Cd}$  autoradiography showed that trichomes accounted for 40% of total leaf radioactive intensity (Huguet *et al.*, 2006). These observations suggest that the role of trichomes for Cd sequestration and detoxification is less important in *A. halleri* than in the non accumulator *A. thaliana* and *A. lyrata*. Moreover, the fact that trichome spots were clearly visible after 3-week exposure and not after 9-week exposure suggests that Cd sequestration in these cells is a short term response to the metal exposure, which hereafter becomes less important compared to the sequestration in the leaf tissue. In other words, Cd content in the trichomes may reach a plateau while Cd content in the tissue keeps increasing with time.

To conclude, this study was the first comparison of Cd localization in *A. halleri* from a metallicolous and non metallicolous origin at the scales of the whole rosette and leaf. It showed that Cd was mainly stored in the leaf tissue, with an enrichment of peripheral tissues after 9-week exposure. Cd distribution in these regions was relatively homogeneous. There was no preferential accumulation in young or in senescent leaves. Trichomes were enriched in Cd, but these cells represented a minor Cd storage site in *A. halleri* (especially for MET plants).

### III.1.6. Acknowledgments

This work was supported by the Nord-Pas de Calais Region and Voies Navigables de France, FEDER funds through French research program « Programme de Recherche Concertées » (PRC “Sites et Sols Pollués, Environnement et Activités

Humaines”), COST Action 859 (STSM-859-03759) and French program ACI/FNS/ECCO (ECODYN, contract no. 04 2 9 FNS). We thank Pierre Saumitou-Laprade from the Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales for providing the mother *A. halleri* plant from metallicolous origin. We also thank Stephanie Szenknect and Georges Gousseau of the L2T laboratory in CEA Grenoble for their help during the autoradiography experiments. Pr. Henk Schat, Riet Vooijs and all members of the Institute of Molecular and Cellular Biology, in Vrije Universiteit Amsterdam (NL) are acknowledged for their help during chemical analyses.

### III.1.7. References

- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126.
- Bert V, Bonnin I, Saumitou Laprade P, de Laguerie P, Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, 155, 47-57.
- Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, 146, 225-233.
- Bert V, Meerts P, Saumitou Laprade P, Salis P, Gruber W, Verbruggen N. 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil*, 249, 9-18.
- Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA. 2004. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environmental Science and Technology*, 38, 5797-5802.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173, 677-702.
- Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 765-775.
- Cosio C, Vollenweider P, Keller C. 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and

- phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 64-74.
- Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N. 2007. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiology*, 144, 1052-1065.
- Craciun AR, Courbot M, Bourgis F, Salis P, Saumitou Laprade P, Verbruggen N. 2006. Comparative cDNA-AFLP analysis of Cd-tolerant and -sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2967-2983.
- Crafts AS, Yamaguchi S. 1964. The autoradiography of plant materials. University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkley. Manual 35.
- Cunningham LM, Collins FW, T.C. Hutchinson. 1975. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity in soybean. 1. Toxicity symptoms and autoradiographic distribution of cd in roots, stems and leaves Paper presented at the International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ont., Canada.
- Dahmani-Muller H, Van-Oort F, Gelie B, Balabane M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 109, 231-238.
- Fukuda N, Hokura A, Kitajima N, Terada Y, Saito H, Abed T, Nakai A. 2008. Micro X-ray fluorescence imaging and micro X-ray absorption spectroscopy of cadmium hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmaifera*, using high-energy synchrotron radiation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 1068–1075.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Kramer U. 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 453, 391-NIL 344.
- Harada E, Choi Y-E. 2008. Investigation of metal exudates from tobacco glandular trichomes under heavy metal stresses using a variable pressure scanning electron microscopy system. *Plant Biotechnology*, 25, 407-411.
- Harada E, Sarret G, Isaure M, Geoffroy N, Fakra S, Marcus M, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A, Choi Y. 2006. Detoxification of zinc in tobacco



- (*Nicotiana tabacum* L.) plants: Exudation of Zn as Ca-containing grains through the trichomes. *Plant and Cell Physiology*, 47, S155-S155.
- Hokura A, Onuma R, Kitajima N, Terada Y, Saito H, Abe T, Yoshida S, Nakai I. 2006. 2-D X-ray fluorescence imaging of cadmium hyperaccumulating plants by using high-energy synchrotron radiation X-ray microbeam. *Chemistry Letters*, 35, 1246-1247.
- Huguet S, Isaure MP, Barthès V, Szenknect S, Saumitou-Laprade P, Bert V, Laboudigue A, Sarret G. 2006. Accumulation of cadmium and zinc in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* studied by autoradiography Paper presented at the Tracer 4, Autrans (France).
- Isaure MP, Fayard B, Sarret G, Pairis S, Bourguignon J. 2006. Localization and chemical forms of cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Spectrochimica Acta B*, 61, 1242–1252.
- Küpper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212, 75-84.
- Lloyd-Thomas D. 1995. Hyperaccumulation of heavy metal by *Thlaspi caerulescens* J&C Presl., University of Sheffield, UK.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytologist*, 145, 11-20.
- Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants, second edition Academic Press, London.
- Martell EA. 1974. Radioactivity of tobacco trichomes and insoluble cigarette smoke particles. *Nature*, 249, 215-217.
- McGrath SP, Lombi E, Gray CW, Caille N, Dunham SJ, Zhao FJ. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*, 141, 115-125.
- Meerts P, Van Isacker N. 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology*, 133, 221-231.
- Page V, Weisskopf L, Felle U. 2006. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist*, 171, 329-341.

- Pauwels M, Frérot H, Bonnin I, Saumitou-Laprade P. 2006. A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1838-1850.
- Peng X, Du J, Fan J, Wang J, Wu Y, Zhao J, Sun S, Xu T. 2007. A selective fluorescent sensor for imaging Cd<sup>2+</sup> in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129, pp 1500-1501.
- Robinson BH, Leblanc M, Petit D, Brooks RR, Kirkman JH, Gregg PEH. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant and Soil*, 203, 47-56.
- Roosens N, Willems G, Saumitou Laprade P. 2008. Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science*, 13, 208-215.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar P, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13, 468-474.
- Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Birschwilks M, Clemens S, Fakra S, Marcus MA, Manceau A. 2006. Trichomes of tobacco excrete zinc as Zn-substituted calcium carbonate and other Zn-containing compounds. *Plant Physiology*, 141, 1021-1034.
- Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V, Proux O, Hazemann JL, Traverse A, Marcus MA, Manceau A. 2002. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 130, 1815-1826.
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E. 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution*, 50, 1888-1895.
- Shen RF, Ma JF. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1683-1687.
- Sinclair SA, Sherson SM, Jarvis R, Camakaris J, Cobbett CS. 2007. The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 174, 39-45.
- Ueno D, Iwashita T, Zhao F, Ma J. 2008. Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd-hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant and Cell Physiology*, 49, 540-548.

- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, 759-776.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S. 2006. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell and Environment*, 29, 950-963.
- Wenzel WW, Jockwer F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. *Environmental Pollution*, 104, pp. 145–155.
- Willems G, Dräger D, Courbot M, Godé C, Verbruggen N, Saumitou-Laprade P. 2007. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, 176, 659-674.
- Zhao F, Jiang RF, Dunham SJ, McGrath SP. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, 172, 646-654.
- Zhao F, Lombi E, Breedon T, McGrath S. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environment*, 23, 507-514.

Table 1: Design of experiments: Number of MET and N-MET *A. halleri* clones and leaves related to experiment 1 and 2 where plants were hydroponically cultivated for 3 and 9 weeks in presence of various Cd and Zn concentrations.

Cd and Zn concentrations in hydroponic solutions	Number of clones studied, and of leaves (in parentheses)			
	MET		N-MET	
	3 weeks	9 weeks	3 weeks	9 weeks
Experiment 1 : Assessment of health plant status, Cd and Zn concentration in aerial plant parts, relative root elongation				
C <sub>0/30</sub> : 0µM Cd + 30µM Zn	3	3	3	3
C <sub>0/300</sub> : 0µM Cd + 300µM Zn	3	3	3	3
C <sub>5/30</sub> : 5µM Cd + 30µM Zn	3	3	3	3
C <sub>5/300</sub> : 5µM Cd + 300µM Zn	3	3	3	3
C <sub>20/30</sub> : 20µM Cd + 30µM Zn	3	3	3	3
C <sub>20/300</sub> : 20µM Cd + 300µM Zn	3	3	3	3
Experiment 2 : Cd localization and compartmentalization in leaves by autoradiography				
*C <sub>5/30</sub> : 5µM Cd + 30µM Zn	1 (1)	2 (3)	1 (1)	1 (3)
*C <sub>5/300</sub> : 5µM Cd + 300µM Zn	1 (1)	2 (3)	1 (1)	1 (3)
*C <sub>20/30</sub> : 20µM Cd + 30µM Zn	1 (1)	2 (3)	1 (1)	1 (3)
*C <sub>20/300</sub> : 20µM Cd + 300µM Zn	1 (1)	2 (3)	1 (1)	1 (3)

Table 2: Assessment of MET and N-MET *A. halleri* clones to tolerance to culture conditions, i.e. in presence of various Cd and Zn concentrations in hydroponic solutions during 9 weeks.

Cd and Zn concentrations in hydroponics	Root Elongation R (cm)		Plants Aspect					
	From T=1,5 to T=9	From T=1 to T=9	Leaf rolling		Reddish leaves		Violet coloration of leaves underside	
	MET	N-MET	MET	N-MET	MET	N-MET	MET	N-MET
C <sub>0/30</sub> : control	6.8 ± 2.8	4.7 ± 2.4	0	+	0	+	0	0
C <sub>0/300</sub>	5.5 ± 2.0	3.8 ± 1.8	0	+	0	-	0	0
C <sub>5/30</sub>	6.8 ± 1.2	2.0 ± 2.6	0	+	0	++	+	+
C <sub>5/300</sub>	4.8 ± 2.4	3.5 ± 2.1	0	+	0	+	+	0
C <sub>20/30</sub>	4.5 ± 1.4	no measure*	0	++	+	+++	++	++
C <sub>20/300</sub>	6.4 ± 2.0	3.2 ± 3.2	0	+	0	+	0	+

Averages of relative root elongations (R) were shown (means ± SD, n=3). R was determined from length data collected at two different times of growth: the first measurement was done at 1.5 (MET) or 1 (N-MET) weeks after the beginning of the metal exposure and at the end of the experiment, i.e. after 9 weeks. Values in the same column are not significantly different at  $p=0.05$ . Plant aspect is showed as deviation from the control plants (+ = increase, - = decrease and 0 = no change).

\* Roots were broken during measurement

Table 3: Percentage of total radioactive intensity measured in different compartments of a representative leaf of *A. halleri* MET and N-MET, after 3- and 9-week exposure to <sup>109</sup>Cd and various Cd and Zn concentrations conditions in hydroponic solutions.

Cd and Zn Concentrations Conditions	Percentage of Radioactive Intensity (%)					
	<i>A. halleri</i> from MET origin			<i>A. halleri</i> from N-MET origin		
	Petiole + Central Vein	Tissue	Trichomes	Petiole + Central Vein	Tissue	Trichomes
3 weeks, for one leaf						
*C <sub>5/30</sub>	43	<b>57 ± 11</b>	1 ± 0.2	23	<b>62 ± 20</b>	15 ± 5
*C <sub>5/300</sub>	30	<b>67 ± 7</b>	3 ± 0.7	12	<b>88 ± 17</b>	-
*C <sub>20/30</sub>	26	<b>72 ± 14</b>	2 ± 0.8	13	<b>85 ± 16</b>	3 ± 0.6
*C <sub>20/300</sub>	39	<b>60 ± 18</b>	1 ± 0.3	20	<b>70 ± 13</b>	10 ± 2.5
	Petiole + Central Vein	Tissue <sup>a</sup>	Peripheral Tissue <sup>a</sup>	Petiole + Central Vein	Tissue <sup>a</sup>	Peripheral Tissue <sup>a</sup>
9 weeks, averages on several leaves						
*C <sub>5/30</sub>	14 ± 2	<b>51 ± 6</b>	36 ± 6	7 ± 2	41 ± 4	<b>52 ± 5</b>
*C <sub>5/300</sub>	20 ± 9	<b>53 ± 5</b>	27 ± 7	6 ± 2	42 ± 3	<b>53 ± 4</b>
*C <sub>20/30</sub>	15 ± 2	<b>44 ± 7</b>	<b>41 ± 7</b>	11 ± 3	<b>54 ± 16</b>	<b>35 ± 16</b>
*C <sub>20/300</sub>	18 ± 7	<b>42 ± 9</b>	<b>40 ± 14</b>	9 ± 4	<b>43 ± 4</b>	<b>49 ± 7</b>

For 3-week exposure and for both origins averages were made on 5 zones for “tissue” compartment and on 10 zones for the “trichomes” compartment. For 9-week exposure, averages were made on 3 representative leaves for 2 clones (n=6) for MET plants, and on 3 representative leaves for only one clone (n=3) for N-MET plants. Maximal values are written in bold.

<sup>a</sup> including trichomes present on the tissue.

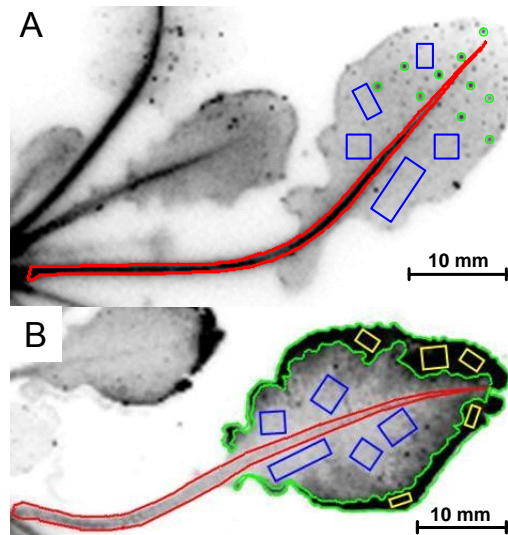


Figure 1: Example of quantification of the radioactive intensities in the leaf compartments of a plant after 3 (A) and 9 (B) weeks of exposure. For the “Petiole and Central Vein” the intensity per unit of surface ( $\text{DLU mm}^{-2}$ ) was measured on the whole compartment (red zone in A and B), for the “Leaf Tissue” measurements on five zones (blue rectangles in A and B) were averaged, for the “Trichomes” measurements on ten trichomes (green circles in A only) were averaged, and for the “Leaf Peripheral Tissue” measurements on five zones (yellow rectangles in B only) were averaged. In addition, total radioactive intensities ( $\text{DLU}_{\text{tot}}$ ) were measured for two compartments: “Petiole + Central Vein” and “Leaf Peripheral tissue” (red zone in A and B, and green zone in B, respectively).

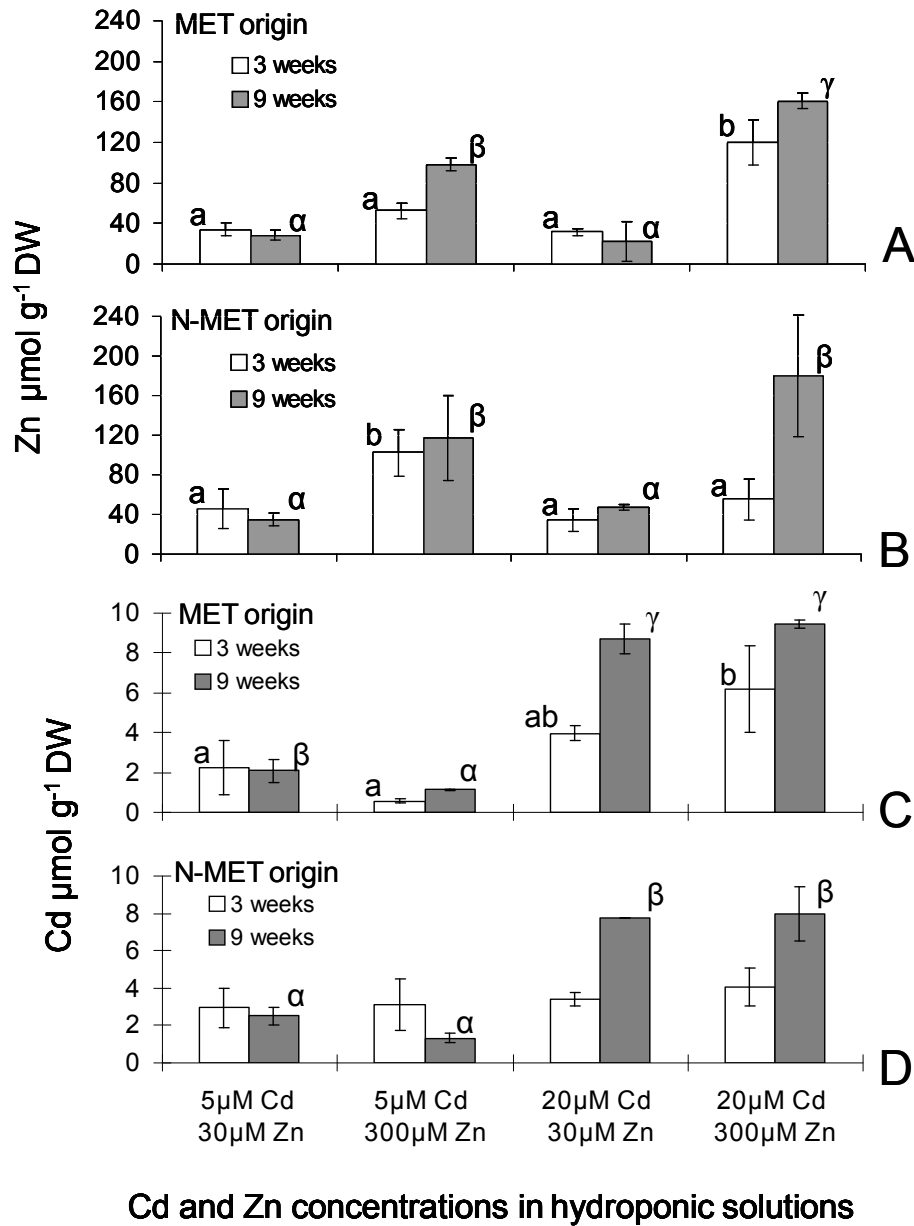


Figure 2: Zn (A,B) and Cd (C, D) concentrations measured in aboveground parts of *A. halleri* from metalicolous (MET) and non-metallicolous (N-MET) origins after 3 weeks (white) and 9 weeks (dark grey) exposure time to various Cd and Zn concentrations (averages and standard deviations over 3 clones). For each graph, results of statistical tests are indicated by Latin and Greek letters for 3-week and 9-week plants, respectively. The same letter indicates that Cd concentrations are not significantly different at the  $P=0.05$  level.



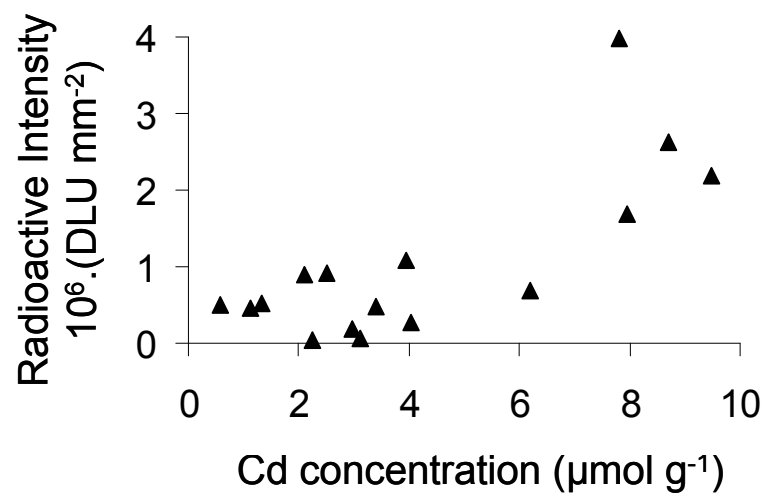


Figure 3: Radioactive intensity per unit of surface measured in the aerial parts measured in the autoradiography experiment as a function of Cd concentration in the aerial parts measured in the Cd accumulation experiment by AAS.

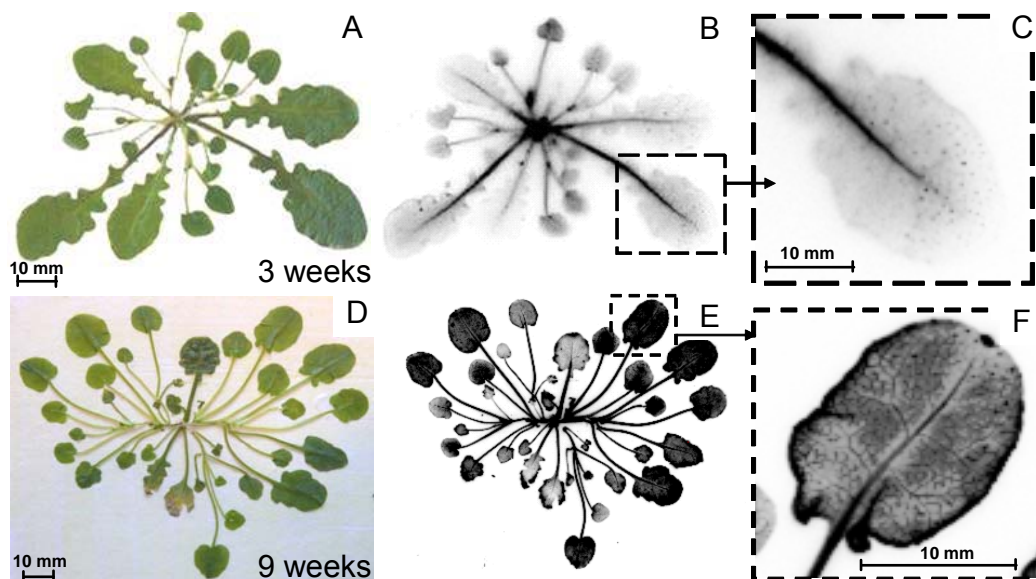


Figure 4: Photographs (A, D) and autoradiographs (B, E) of *A. halleri* MET exposed for 3 and 9 weeks to the  $^{*}\text{C}_{20/30}$  treatment. On autoradiographs dark regions correspond to  $^{109}\text{Cd}$ -enriched zones. Zooms on a mature leaf representative in terms of radioactive intensity are shown in (C, F). These zoomed images presented a treatment; indeed, the gray scale was adjusted in order to visualize the different compartments of the leaf.

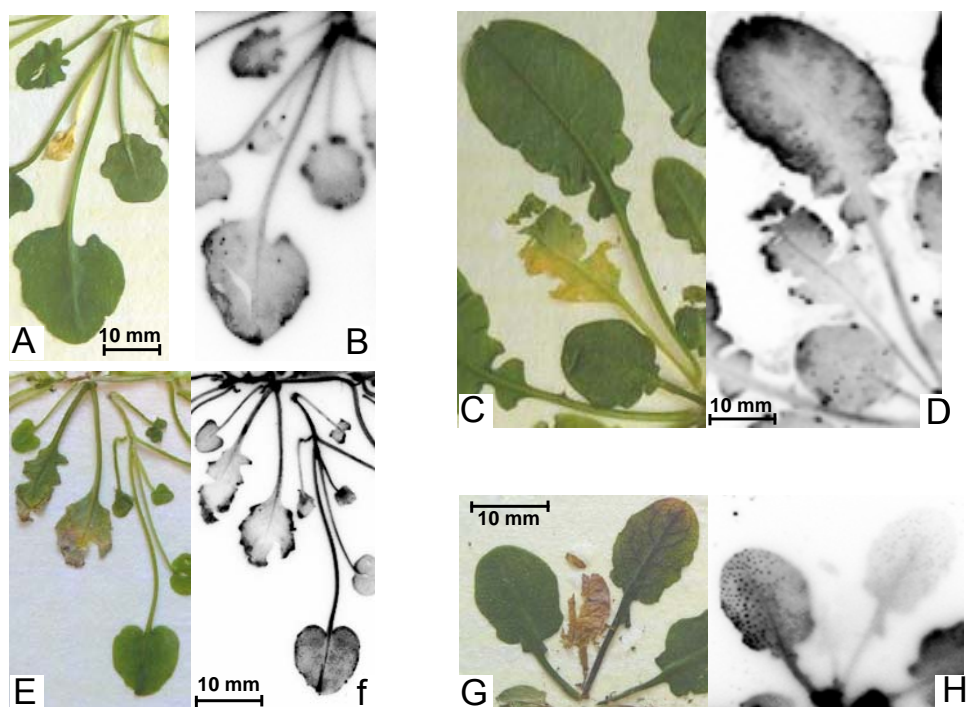


Figure 5: Photographs (A, C, E, G) and their associated autoradiographs (B, D, F, H respectively) of leaves of *A. halleri* MET (A, E) and N-MET (C, G) exposed for 9 weeks to  $^{109}\text{Cd}_{5/30}$  (A, C) and  $^{109}\text{Cd}_{20/30}$  (E, G) treatments. The yellowish leaves and dry leaves were not enriched in Cd.

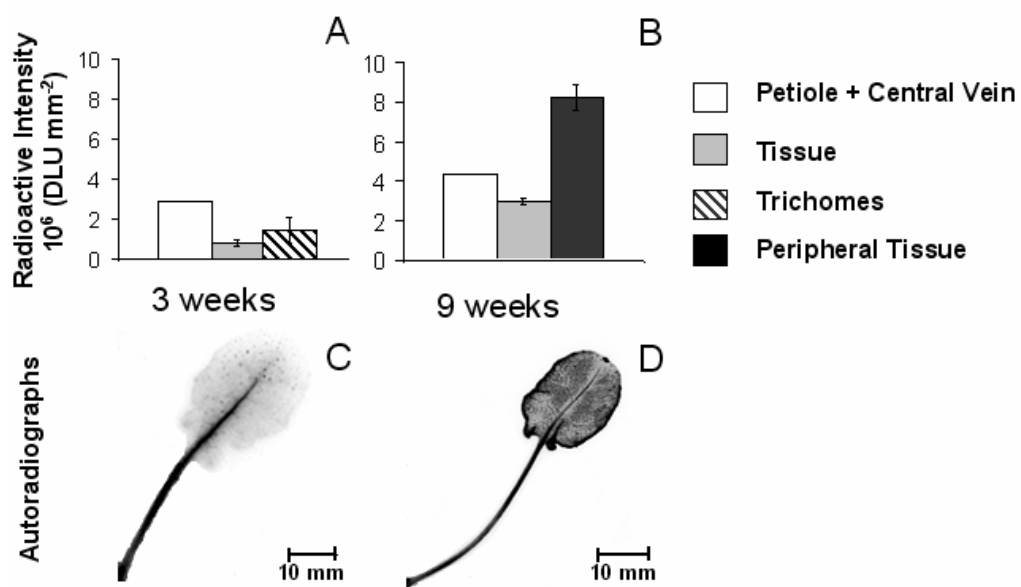


Figure 6: Radioactive intensities per unit of surface measured in different compartments of a representative mature leaf of *A. halleri* from MET origin, after 3 and 9 weeks exposure to  $^{109}\text{Cd}$  (respectively A and B), for “ $20\mu\text{M Cd} + 30\mu\text{M Zn}$ ” condition. For the 3 weeks clone, 3 compartments were defined: « Petiole + Central Vein », « Tissue » and « Trichomes », whereas for 9 weeks clones, compartments were « Petiole + Central Vein », « Tissue » and « Peripheral Tissue ». Bars represent  $\pm$  standard deviations (n=1 for “Petiole + Central Vein” compartment, n=5 for “Tissue” and “Peripheral Tissue” compartments, n=10 for “Trichomes” compartment)

## **III.2. Spéciation du Cd dans les parties aériennes d'*A. halleri***

### **III.2.1. Matériel et Méthodes**

La description des plantes étudiées et des conditions de culture sont détaillées dans la partie introductive et dans « *materials and methods* » du projet d'article sur la localisation du Cd dans les parties aériennes de *A. halleri* par autoradiographie (section III-1). Les conditions de concentrations en Cd et en Zn dans les solutions hydroponiques sont également les mêmes.

#### **III.2.1.1. Analyses EXAFS : préparation des échantillons et acquisition des données.**

L'étude de la spéciation a été menée sur les plantes cultivées sur toutes les conditions de concentrations en Cd et Zn décrites dans la partie III.1 mais uniquement pendant 9 semaines. Ce temps d'exposition relativement long permet de s'assurer que l'état observé n'est pas un état transitoire en réponse immédiate à une exposition. En analyse globale EXAFS, un spectre correct est enregistré sur des échantillons de plantes contenant au minimum une centaine de ppm de Cd.

L'étude de la spéciation des feuilles d'*A. halleri* nécessite des échantillons de plante frais. Pour les trois plantes, les feuilles sénescentes ou jaunâtres ont été enlevées. Les parties aériennes des 3 plantes ont été poolées, puis l'ensemble des feuilles a été réparti en 2 catégories : les feuilles jeunes et les feuilles matures (cf définition section III.1.3.4). Nous avons poolé les trois plantes car on ne peut pas se permettre, aux vues du temps de faisceau accordé, de passer un échantillon en triplicat, nous avons privilégié l'étude de l'influence des concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique. Chaque pool de feuilles jeunes et de feuilles matures pour une concentrations en Cd et Zn données est immédiatement plongé, puis broyé dans de l'azote liquide afin de préserver au mieux la spéciation du Cd dans les feuilles. Une pastille est alors préparée dans de l'azote liquide. Cette préparation délicate est nécessaire afin de s'affranchir au maximum d'un éventuel changement de spéciation du Cd dans les feuilles pouvant être provoqué par un changement de température du à la décongélation de l'échantillon. Dix pastilles de feuilles (Tab. III-4) ont été

analysées sur la ligne FAME (ESRF, Grenoble – cf section II-1.6.3.1) à 10°K dans un cryostat à Hélium. Les spectres ont été enregistrés en mode de fluorescence au seuil K du Cd (26.711 KeV). Les spectres présentés dans les résultats sont la somme d'une dizaine de scans. Le Cd étant présent dans de faibles concentrations, il convient d'accumuler assez de scans pour optimiser le rapport signal/bruit. Dans cette étude, des scans de 45 min sont sommés afin d'obtenir au moins 10<sup>5</sup> coups de fluorescence de Cd par seconde après le seuil d'absorption. Les spectres obtenus sont traités (calibration, normalisation) et exploités (reconstruction par combinaison linéaire (CL) et modélisation numérique du signal EXAFS) de la même façon que les spectres enregistrés sur les pastilles de sédiment précédemment étudiées (cf section II-1.6.3.1 et fig. II-12). La base de données des spectres des composés de référence utilisée pour les CL est la même que celle utilisée précédemment pour les échantillons de sédiment (cf section II.3.1.1 et Annexe II-7).

Tableau III-4 : Récapitulatif des échantillons étudiés par spectroscopie EXAFS (FM : feuilles matures, FJ : feuilles jeunes).

Concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique	<i>A. halleri</i> origine MET	<i>A. halleri</i> origine N-MET
5 µM Cd + 30 µM Zn	FM	FM
5 µM Cd + 300 µM Zn	FM	FM
20 µM Cd + 30 µM Zn	FM + FJ	FM + FJ
20 µM Cd + 300 µM Zn	FM	FM

### III.2.1.2. Analyses chimiques : détermination des concentrations en phytochélatines (PC) et glutathion (GSH)

Les phytochélatines sont des peptides de structure (γ-glu-cys)n-gly, dans laquelle n peut s'étendre de 2 à 11 (Grill et al., 1989). Quand n=1, ce tripeptide est appelé glutathion. Les peptides se lient aux métaux par liaison avec l'atome de S du groupement thiol (SH-). Les structures contenant des groupements thiols telles que PC, glutathion, cystéine, métallothionéine, peuvent être séparées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Avant les injections, les différents groupements thiols sont dérivatisés par un composé fluorescent (le monobromebimame).

Le dosage des concentrations en phytochélatines et glutathion a été effectué à l’Institut de Biologie Cellulaire et Moléculaire (Vrije Universiteit – Amsterdam). Les échantillons de plantes préparées, congelées et conservées à -80°C ont été transportées dans de la glace carbonique.

La première étape a été de broyer dans l’azote liquide les parties aériennes de chaque clone d’*A. halleri* afin de réaliser des dosages en triplicat pour chaque condition, soit un total de 72 plantes pour les MET et 36 plantes pour les N-MET (Tab. III-5).

Tableau III-5: Récapitulatif du matériel végétal analysé en fonction des conditions expérimentales testées et au cours de l’expérience

Temps d'exposition	Concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique	<i>Arabidopsis halleri</i> (2 origines) nombre de clones analysés	
		MET	N-MET
9 semaines	0 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	0 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
	5 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	5 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
	20 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	20 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
3 semaines	0 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	0 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
	5 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	5 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
	20 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	3
	20 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	3
14 jours	0 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	0 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	
	5 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	5 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	
	20 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	20 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	
4 jours	0 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	0 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	
	5 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	5 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	
	20 $\mu$ M Cd + 30 $\mu$ M Zn	3	
	20 $\mu$ M Cd + 300 $\mu$ M Zn	3	

D’un point de vue expérimental, la procédure générale de dosage des PC et du GSH repose sur 2 étapes principales : l’extraction puis la dérivation des thiols. Le protocole suivi est décrit ci-dessous (un protocole plus détaillé est fourni en Annexe III-5).

### Extraction des thiols

20 mg de feuilles fraîches congelées ont été broyées dans l'azote liquide et homogénéisées dans un mortier contenant du sable de quartz, 990  $\mu$ L de DTPA-TFA (6.3 mM diethylenetriamine-pentaacetic l'acide - 0.1 % trifluoroacetic ; diminue l'oxydation des groupements thiols par le métal), 20  $\mu$ L NAC (1 mM N-acétylcystéine). Après l'homogénéisation, 990  $\mu$ L NAC ont été ajoutés. La mixture obtenue a été mélangée mécaniquement (ultrasonicateur) et transvasée dans un tube Eppendorf de 2 ml, puis, les cellules extraites ont été centrifugées pendant 15 min, à 4°C et à 13 000 tr/min (centrifugeuse Eppendorf). 500  $\mu$ L du surnageant ont été prélevés puis filtrés à 0.2  $\mu$ m (Costar-spin-filter Eppendorf 0.2  $\mu$ m) après une brève agitation mécanique (ultrasonicateur).

### Dérivatisation des thiols

250  $\mu$ L du filtrat ont été pipetés et introduits dans un vial pour autosampler. 10  $\mu$ L monobromebimane (réactif pour la dérivation des thiols) et 450  $\mu$ L de HEPS-DTPA (200 mM HEPS-6.3mM DTPA) ont été ajoutés. Après agitation mécanique, les vials ont été placés pendant 30 min dans un bain-marie maintenu à 45°C dans l'obscurité. Ensuite, 300  $\mu$ L de MSA (1 mM) ont été ajoutés pour arrêter la réaction. Après une dernière agitation manuelle, les échantillons ont été stockés à 4°C avant les analyses en HPLC.

Les PC et le GSH ont été séparés sur une colonne C<sub>18</sub> Nova-Pak (6 nm, 4  $\mu$ m, 3.9  $\times$  300 mm, Waters, Milford, MA) à 37°C. L'échantillon a été injecté et élué avec un gradient légèrement concave de 12 % à 25 % (v/v) de méthanol pendant 15 min et ensuite un gradient linéaire de 25 % à 50 % (v/v) de méthanol de 15 à 50 min. L'analyse a été effectuée par HPLC couplée d'un détecteur de fluorescence dont la limite de détection est de l'ordre de pM (Waters 474 fluorescence detector). Du glutathion réduit a été utilisé comme standard externe. Les concentrations de PC ont été calculées comme des  $\mu$ mol d'équivalent GSH par gramme de poids sec et corrigées en fonction de l'efficacité de la dérivation (Sneller et al., 2000).



### III.2.2. Résultats

L'inspection visuelle des plantes tout au long de la culture, même pour les temps les plus longs (9 semaines – fig. III-7) ainsi que la mesure de l'élongation racinaire (résultats non présentés) ont montré que les plantes se sont développées sur toutes les conditions de culture.

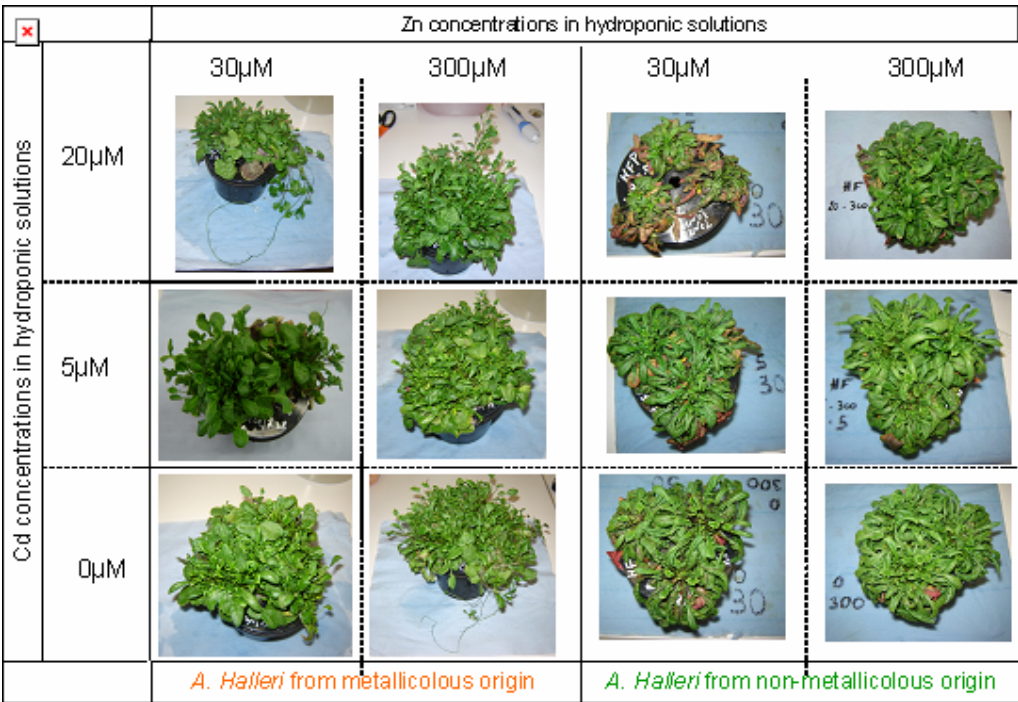


Figure III-7 : Clones d'*A. halleri* d'origine MET et N-MET après 9 semaines de culture en hydroponie sur différentes concentrations en Cd et Zn. Chaque pot contient 3 clones.

#### III.2.2.1. Détermination de la spéciation moyenne du Cd : exploitation des spectres par combinaison linéaire.

La figure III-8 présente tous les spectres expérimentaux enregistrés au seuil K du Cd sur les feuilles d'*A. halleri* pour les 2 origines et pour toutes les conditions de culture. Les spectres présentent de grandes similarités. Toutefois, le spectre enregistré sur les jeunes feuilles d'*A. halleri* N-MET cultivée pour la condition C<sub>20-30</sub> semble légèrement décalé en fréquence par rapport aux autres, ce qui suggère une spéciation du Cd légèrement différente par rapport aux autres échantillons.

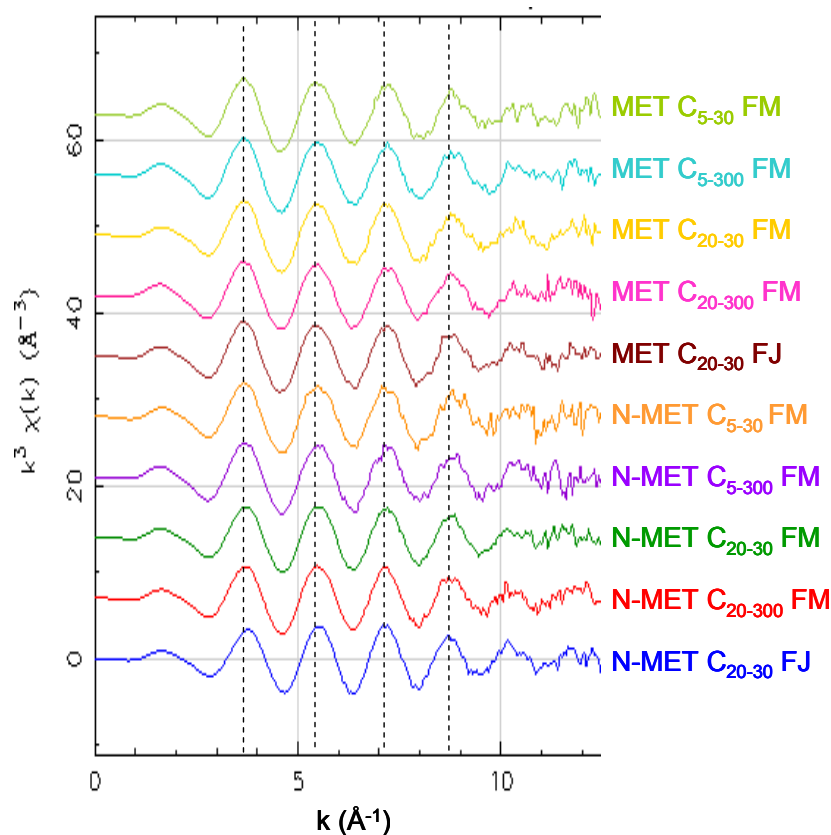


Figure III-8: Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur des échantillons de feuilles jeunes (FJ) et matures (FM) d'*A. halleri* d'origine MET et N-MET pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique (C<sub>5-30</sub> : 5 μM Cd + 30 μM Zn; C<sub>5-300</sub> : 5 μM Cd + 300 μM Zn; C<sub>20-30</sub> : 20 μM Cd + 30 μM Zn et C<sub>20-300</sub> : 20 μM Cd + 300 μM Zn).

Les transformées de Fourier (TF) des spectres se caractérisent toutes par la présence d'un pic principal, correspondant à la première couche de coordination, et la quasi absence de pics à plus grande distance (Fig. III-9). Le premier pic de la TF de l'échantillon de jeunes feuilles d'*A. halleri* N-MET cultivées pour la condition C<sub>20-30</sub> est légèrement décalé (vers la droite) par rapport aux autres (Fig. III-9).

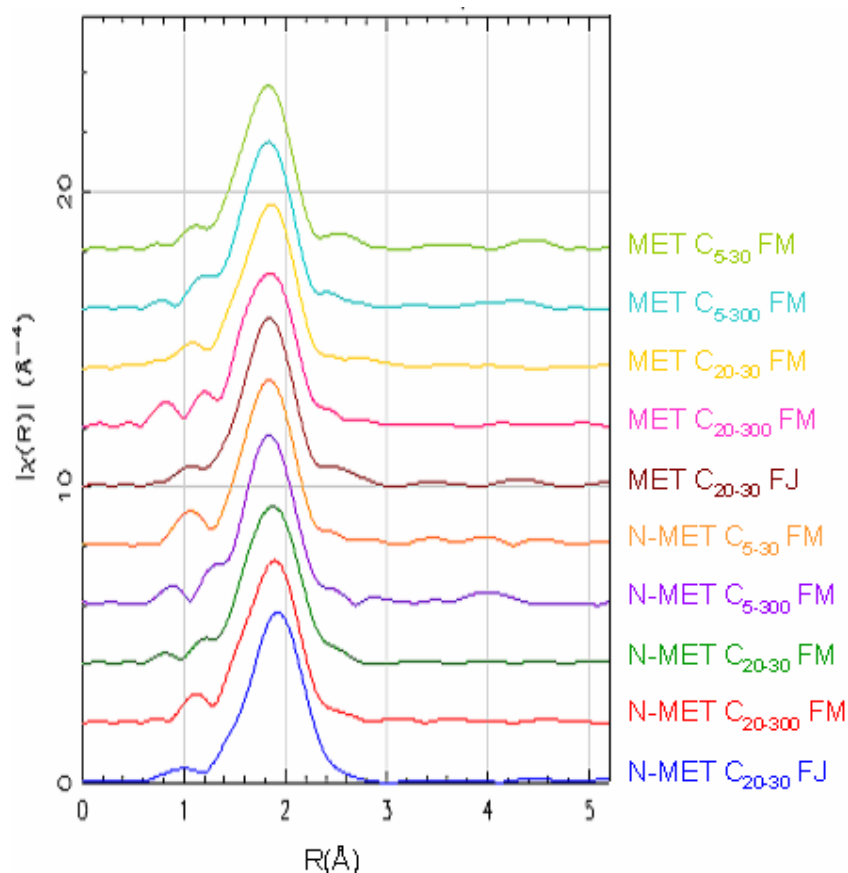


Figure III-9: Transformées de Fourier des spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur des échantillons de feuilles jeunes (FJ) et matures (FM) d'*A. halleri* d'origine MET et N-MET pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique (C<sub>5-30</sub> : 5µM Cd + 30 µM Zn; C<sub>5-300</sub> : 5µM Cd + 300 µM Zn; C<sub>20-30</sub> : 20µM Cd + 30 µM Zn et C<sub>20-300</sub> : 20µM Cd + 300 µM Zn).

Un examen plus précis en superposant toutes les TF des spectres enregistrés sur les feuilles matures d'*A. halleri* MET pour toutes les conditions de concentrations testées montre que pour une concentration de 5µM de Cd, les deux TF sont superposables, seules les amplitudes changent (Fig. III-10). Ceci peut suggérer qu'il n'y a pas d'influence de la concentration en Zn sur la spéciation du Cd. En revanche, pour une concentration de 20µM de Cd et des concentrations de 30µM et 300 µM de Zn, les TF montrent tout d'abord un léger décalage entre elles mais aussi un léger décalage par rapport aux TF des spectres enregistrés pour la concentration en Cd plus faible (Fig. III-10). Ceci suggère des spéciations différentes pour chacune des conditions de concentrations. Ces différentes formes du Cd pourraient

être une réponse de la plante face au stress provoqué par les fortes concentrations en Cd mais aussi en Zn.

Pour les plantes N-MET, toutes les TF présentent une différence dans l'allure des pics (Fig. III-10). Ceci suggère des spéciations du Cd différentes qui dépendent des conditions de concentrations mais aussi de l'âge de la feuille. Les décalages entre les TF sont plus visibles chez les plantes N-MET.

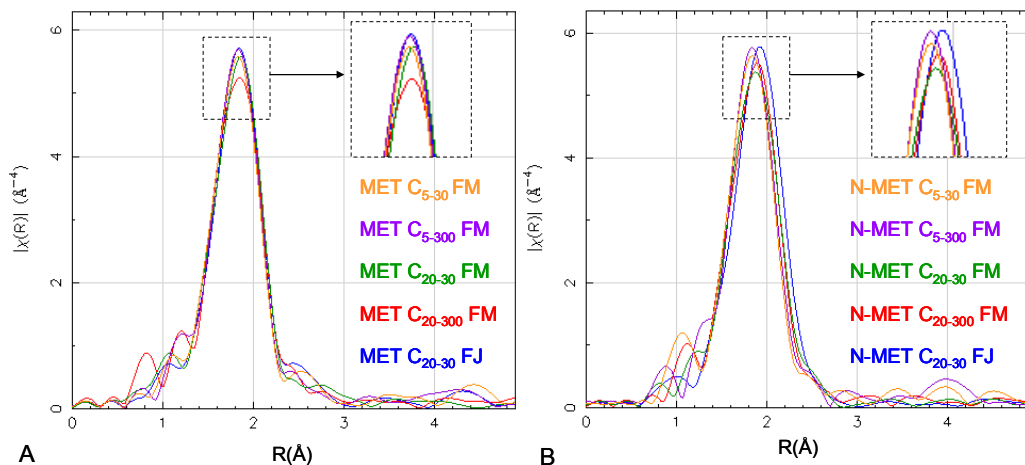


Figure III-10: Transformées de Fourier superposées des spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur les échantillons de feuilles jeunes (FJ) et matures (FM) d'*A. halleri* d'origine MET (A) et N-MET (B) pour les différents traitements en Cd et Zn présents dans la solution hydroponique (C<sub>5-30</sub> : 5 μM Cd + 30 μM Zn; C<sub>5-300</sub> : 5 μM Cd + 300 μM Zn; C<sub>20-30</sub> : 20 μM Cd + 30 μM Zn et C<sub>20-300</sub> : 20 μM Cd + 300 μM Zn)

D'un point de vue qualitatif, on se propose de comparer les spectres et les TF des spectres expérimentaux les plus différents (MET C<sub>5-300</sub> FM, MET C<sub>20-30</sub> FJ et N-MET C<sub>20-30</sub> FJ) aux spectres des composés de références et à leur TF (Fig. III-11). La comparaison montre que les spectres expérimentaux sont intermédiaires aux spectres des familles Cd-COOH/OH et Cd-thiols. L'échantillon dont le spectre est le plus différent des autres, à savoir N-MET C<sub>20-30</sub> FM, est le spectre le plus proche de celui de la référence Cd-thiols (Fig. III-11 A, B). Ce spectre est reconstruit par  $41 \pm 2$  % de Cd-thiols et  $72 \pm 2$  % par Cd-COOH/OH (Tab. III-6).

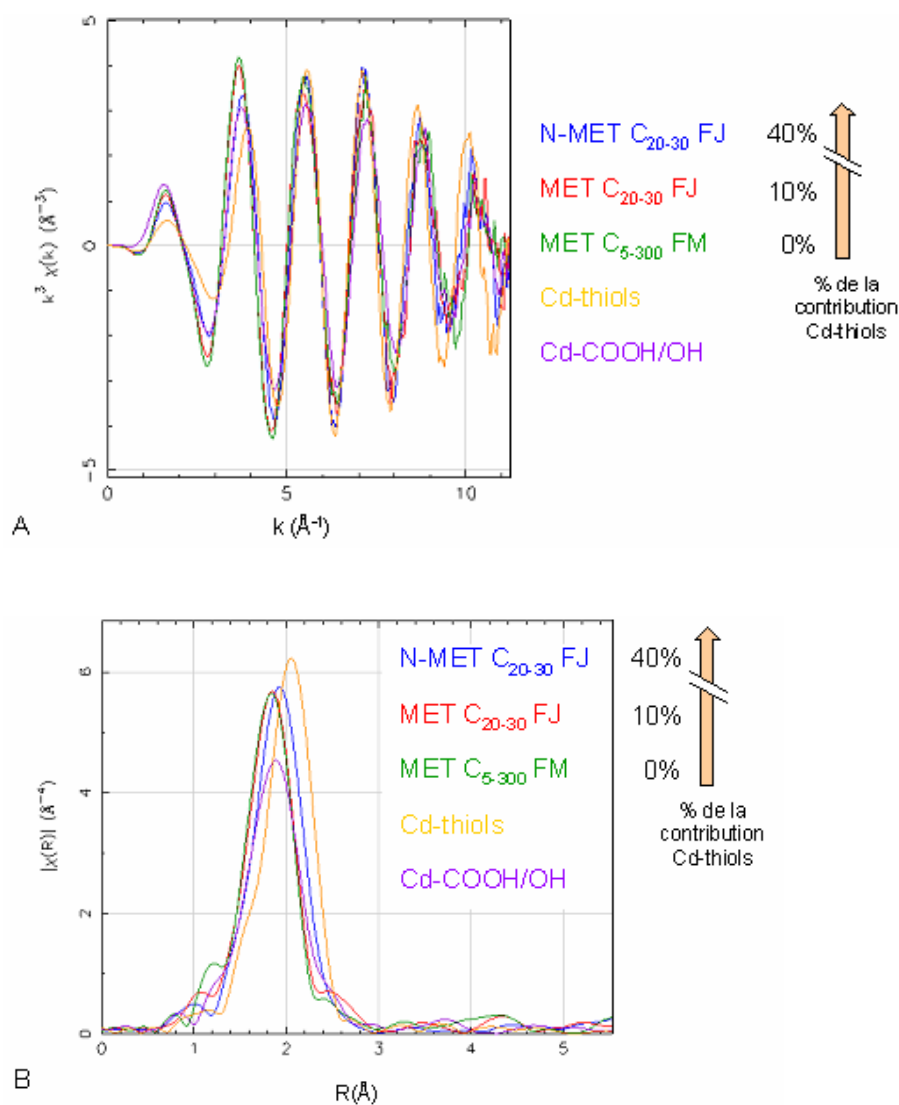


Figure III-11: (A) Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd et (B) TF associées, pour les échantillons de plantes présentant des niveaux de contribution de l'espèce Cd-thiols représentatifs, à savoir les extrêmes : 0% de Cd-thiols pour les feuilles matures MET sur  $C_{5-300}$ , et 40%, le maximum, pour les feuilles jeunes N-MET sur  $C_{20-30}$ , ainsi qu'un pourcentage intermédiaire au niveau de la zone critique de l'erreur sur la méthode : 10% pour les feuilles jeunes MET sur  $C_{20-30}$ , l'erreur sur la méthode étant de 20%..

Les résultats de l'exploitation des spectres par combinaison linéaire sont présentés dans le tableau III-6 ci-dessous et des exemples de simulations obtenues sont présentées en annexe III-6.

Tableau III-6: Distribution des deux principales familles d'espèces de Cd déterminée par combinaison linéaire des spectres EXAFS des plantes (% molaire)

Echantillons				Distribution des familles d'espèces de Cd (% molaire)		
Feuille	Origine	Condition Cd	Zn	Cd-COOH/OH <sup>a</sup>	Cd-thiols <sup>b</sup>	Somme
mature	MET	5	30	103 ± 2	16 ± 1	119 ± 2
mature	MET	5	300	106 ± 5	-	106 ± 5
mature	MET	20	30	79 ± 2	16 ± 2	95 ± 1
mature	MET	20	300	101 ± 7	-	101 ± 7
jeune	MET	20	30	100 ± 3	9 ± 1	110 ± 3
mature	N-MET	5	30	86 ± 7	19 ± 2	105 ± 6
mature	N-MET	5	300	112 ± 3	-	112 ± 3
mature	N-MET	20	30	83 ± 10	28 ± 6	111 ± 6
mature	N-MET	20	300	64 ± 3	34 ± 3	98 ± 0
jeune	N-MET	20	30	72 ± 2	41 ± 2	114 ± 2

Valeur = moyenne ± écart-types, réalisés sur toutes les valeurs de contributions obtenues par les simulations par CL considérées comme acceptables, i.e. pour une diminution du coefficient nulle ou inférieure à 20 %

<sup>a</sup> : Famille Cd-COOH/OH simulée par les spectres de Cd-pectine, Cd-cellulose, Cd-malate, Cd-citrate (cf section II.3.1.1 et Annexe II-7 pour le détail des composés de référence).

<sup>b</sup> : Famille thiols simulée par Cd-cystéine, Cd-glutathion et Cd-PC

Les spectres ont été correctement reconstruits par un mélange de deux types de composés de référence : des composés où le Cd est lié aux groupements carboxyles et/ou hydroxyles (Cd-COOH/OH), avec de l'oxygène dans la première couche de coordination, et des composés où le Cd est lié à des groupements thiols (Cd-thiols), avec du soufre dans la première couche de coordination.

Les composés de référence utilisés pour la première famille de composés sont les complexes Cd-pectine, Cd-paroi cellulaire végétale (échantillons solides), et les complexes Cd-malate et Cd-citrate en solution (Tab. III-6). Les spectres EXAFS de ces composés sont très proches entre eux, mais aucun ne semble convenir pour simuler l'ensemble des données. Il en est de même pour la famille des Cd-thiols. Les composés de référence utilisés sont les complexes Cd-glutathion, Cd-cystéine et Cd-phytochélatine, tous en solution. Il convient de noter que la référence Cd-métallothionéine fournit des simulations de moins bonne qualité que les trois précédentes. Les métallothionéines contiennent généralement des clusters de métaux, chaque atome de Cd a donc des atomes de Cd en seconds voisins, alors que dans les trois autres complexes le cadmium est lié à la molécule organique uniquement.

La proportion de Cd-COOH/OH varie de 64 ± 3 à 112 ± 3 % alors que celle de Cd-thiols varie de 0 à 41 ± 2 %. Ces résultats sont cohérents avec les observations faites

qualitativement. Pour chaque échantillon, la somme des deux types de complexes n'est pas égale à 100% mais légèrement supérieure ou inférieure. Cela peut provenir de la procédure de normalisation des spectres qui peut induire des erreurs en amplitude. Mais cela provient surtout du fait que la base de données de standard est limitée, et que la structure locale du Cd dans un échantillon de plante n'est probablement pas exactement identique à celle de composés de référence présentant certaines caractéristiques (un seul ligand, rapport métal/ligand et pH donnés). Le logiciel ajuste les spectres en augmentant l'amplitude des spectres de référence des familles Cd-COOH/OH et Cd-thiols (Fig. III-11).

La figure III-12 permet de comparer les pourcentages des deux espèces après normalisation des pourcentages.

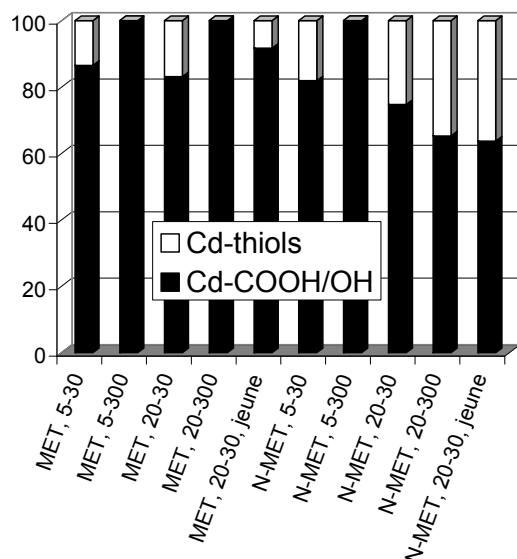


Figure III-12 : Distribution des deux familles d'espèce de Cd dans les échantillons, après normalisation des pourcentages. L'incertitude est de  $\pm 20\%$ .

Certains spectres (plantes MET en conditions  $C_{5/300}$  et  $C_{20/300}$  et plantes N-MET en conditions  $C_{5/300}$ ) sont uniquement reconstitués par des espèces de Cd associé au ligand O. Les échantillons d'*A.halleri* N-MET semblent contenir une plus forte proportion de Cd associé à des ligands soufrés que les MET (Fig. III-12).

Un effet de la concentration en Zn dans le milieu de culture est observé pour les plantes MET : les feuilles des plantes cultivées sur 300  $\mu\text{M}$  Zn ne contiennent pas de Cd-thiols, contrairement à celles cultivées sur 30  $\mu\text{M}$  Zn (Tab. III-6 et Fig. III-

12). Cet effet est observé pour les plantes N-MET uniquement pour la condition 5  $\mu\text{M}$  Cd, et pas pour 20  $\mu\text{M}$  Cd. On observe une augmentation de la proportion de Cd-thiols avec la concentration en Cd en solution pour les plantes MET aux deux concentrations en Zn et pour les N-MET à 300  $\mu\text{M}$  Zn. Enfin, on n'observe pas de différence très nette entre feuilles jeunes et matures pour les plantes MET, alors que pour les N-MET les feuilles jeunes contiennent un plus fort pourcentage de Cd-thiols ( $41 \pm 2 \%$ ).

Les observations évoquées dans le paragraphe ci-dessus sont à relativiser. En effet, les échantillons MET C<sub>5-30</sub> FM et MET C<sub>20-30</sub> FM, ou encore la paire N-MET C<sub>5-30</sub> FM et N-MET C<sub>5-300</sub> FM, montre des proportions en Cd-COOH/OH et Cd-thiols différentes, en revanche, leurs spectres sont quasiment superposables (Fig. III-10). L'incertitude sur les pourcentages obtenus par CL est de 20%. Afin de vérifier si cette incertitude est réelle ou si les spectres, bien que quasi-superposables, témoignent d'une spéciation spécifique, il aurait été utile d'enregistrer des spectres sur des répliquats d'échantillons.

#### **III.2.2.2. Détermination des paramètres structuraux de l'environnement global du Cd : exploitation des spectres par simulation numérique**

Les spectres ont ensuite été traités par simulation numérique afin de déterminer les paramètres structuraux de la première couche de coordination.

On se propose de décrire 3 échantillons présentant des proportions en COOH/OH et Cd-thiols contrastées : les feuilles matures MET sur C<sub>5-300</sub> (0% de Cd-thiols), les feuilles jeunes N-MET sur C<sub>20-30</sub> (40% de Cd-thiols), et les feuilles jeunes MET sur C<sub>20-30</sub> (10% de Cd-thiols).

Les structures utilisées pour le calcul des fonctions FEFF sont CdS et C<sub>4</sub>H<sub>12</sub>Cd<sub>2</sub>O<sub>14</sub>. Nous avons testé la simulation de la première couche de coordination avec seulement des atomes d'oxygène et avec un mélange de O et S. Les résultats sont présentés sur la figure III-13 et dans le tableau III-7.

Pour l'échantillon constitué à 40 % par Cd-thiols (Fig. III-13-A), la simulation avec O et S est nettement meilleure que celle avec O seulement. La simulation est



également améliorée, mais dans une moindre mesure, pour l'échantillon contenant 10 % de Cd-thiols (Fig. III-13-B). Pour l'échantillon contenant 0% de Cd-thiols, une très légère amélioration est observée (Fig. III-13-C).

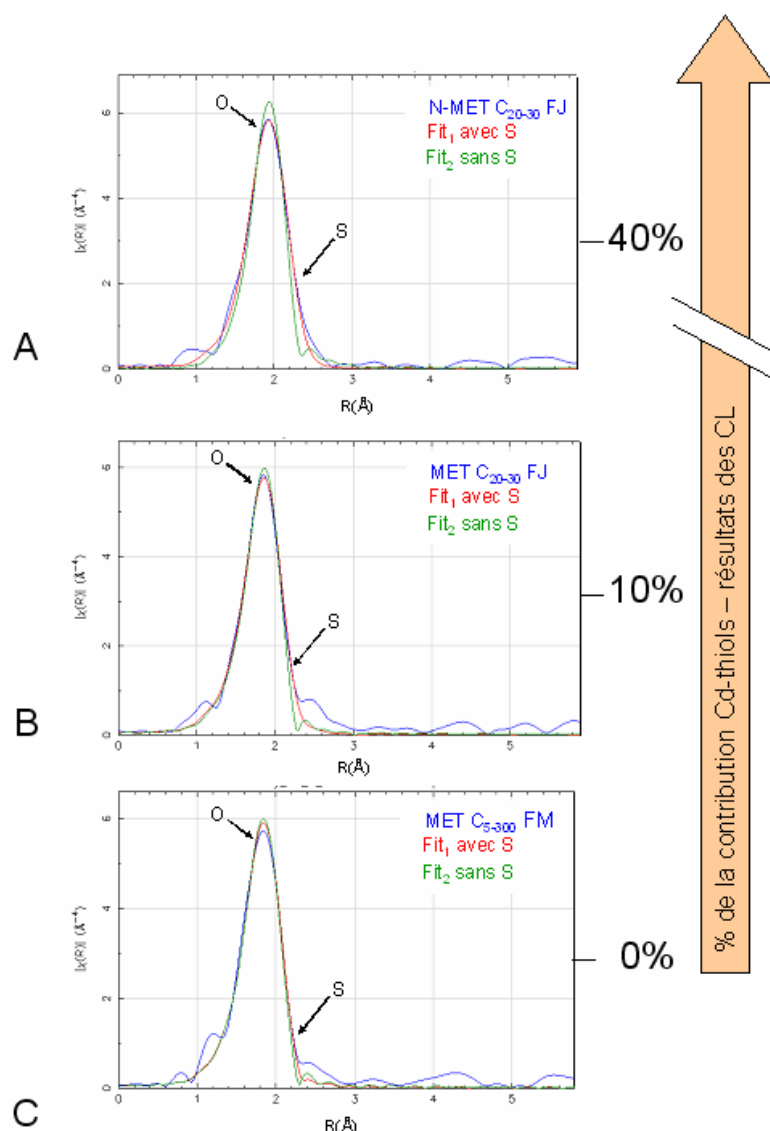


Figure III-13: Spectres EXAFS enregistrés au seuil K du Cd sur les feuilles d'*Arabidopsis halleri* pour trois traitements en Cd et Zn dans la solution (bleu), et spectres obtenus par simulation FEFF avec seulement du O pour la première couche (vert) et avec du S et du O pour la première couche (rouge).

Le tableau III-7 donne les paramètres obtenus avec un mélange O et S. Pour les trois échantillons, les distances interatomiques Cd-O et Cd-S sont identiques (2.31 et 2.53 Å respectivement). En revanche, la proportion de chaque atome varie. Pour l'échantillon de feuilles jeunes d'*A. halleri* N-MET cultivée sur C<sub>20/30</sub>, la première

couche est simulée par 3.8 atomes de O et 2.3 atomes de S. Ceci équivaut à 37.5 % d'atomes de S, ce qui est cohérent avec le résultat obtenu par la méthode d'ajustement des spectres par CL (41% de Cd thiols, soit 37.5% après normalisation de la somme à 100 %). Pour les échantillons d'*A. halleri* MET cultivées sur C<sub>5/300</sub> (feuilles matures) et C<sub>20/30</sub> (feuilles jeunes), la première couche contient respectivement 8 et 17 % d'atomes de S. Ces valeurs sont cohérentes avec les résultats obtenus par ajustement par CL compte tenu de l'incertitude de  $\pm 20\%$ .

Tableau III-7: Paramètres structuraux déterminés par simulation FEFF pour des feuilles d'*Arabidopsis halleri* pour trois traitements en Cd et Zn.

Echantillon	k range	R range	atomes	N	R (Å)	$\sigma^2$	R factor
MET C <sub>5-300</sub> FM	[ 3.2 - 11.6 ]	[ 0.9 - 3.6 ]	O	5.8	2.31	0.0070	0.0004
			S	0.5	2.53	0.0080	
MET C <sub>20-30</sub> FJ	[ 3.2 - 12.6 ]	[ 1.24 - 3.6 ]	O	5.1	2.31	0.0070	0.0003
			S	1.1	2.53	0.0080	
N-MET C <sub>20-30</sub> FJ	[ 3.2 - 12.3 ]	[ 1.22 - 3.5 ]	O	3.75	2.32	0.0070	0.0001
			S	2.25	2.53	0.0080	

k range et R range représente les intervalles utilisés pour les simulations, N représente le nombre d'atomes présents sur la première couche de coordination, R est la distance entre l'atome cible de Cd et les atomes de la première couche de coordination,  $\sigma^2$  est un paramètre de désordre et R factor est le résidu.

### III.2.2.3. Concentrations en phytochélatines et glutathion.

Nous venons de voir que le Cd présent dans les feuilles d'*A. halleri* est lié à des groupements COOH/OH et thiols. Mais l'EXAFS ne nous a pas permis de distinguer à quelle(s) espèce(s) appartiennent les ligands S mis en évidence (cystéine ou glutathion, ou phytochélatines). Il en est de même pour les ligands O (acides organiques et/ou polysaccharides de la paroi cellulaire).

La détermination des concentrations en ligands candidats nous permettrait de déterminer lesquels sont les plus probables et lesquels peuvent être écartés. Plusieurs études ont montré que *A. halleri* possède de façon constitutive de fortes concentrations en acides organiques, notamment du malate, citrate et oxalate (Zhao et al., 2000; Sarret et al. 2002, Sarret et al., 2009). Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur les PC et le glutathion. Ces deux composés ont été mesurés après 9 semaines d'exposition au Cd, mais aussi à des temps plus courts : 4 jours, 14 jours et

3 semaines. Le but était de comparer la réponse à court et long terme des plantes à l'exposition au Cd.

### III.2.2.3.1. Concentrations en phytochélatines

Les PC (PC2 (pour n=2), PC3 et PC4) ont été mesurées par HPLC dans tous les échantillons d'*A. halleri* préparés (cf section III.2.1.2).

Tous les chromatogrammes obtenus sont tels que celui présenté ci-dessous (Fig. III-14) ; Nous n'avons détecté de PC dans aucun des échantillons, mêmes ceux dont le temps de culture était court (4j).

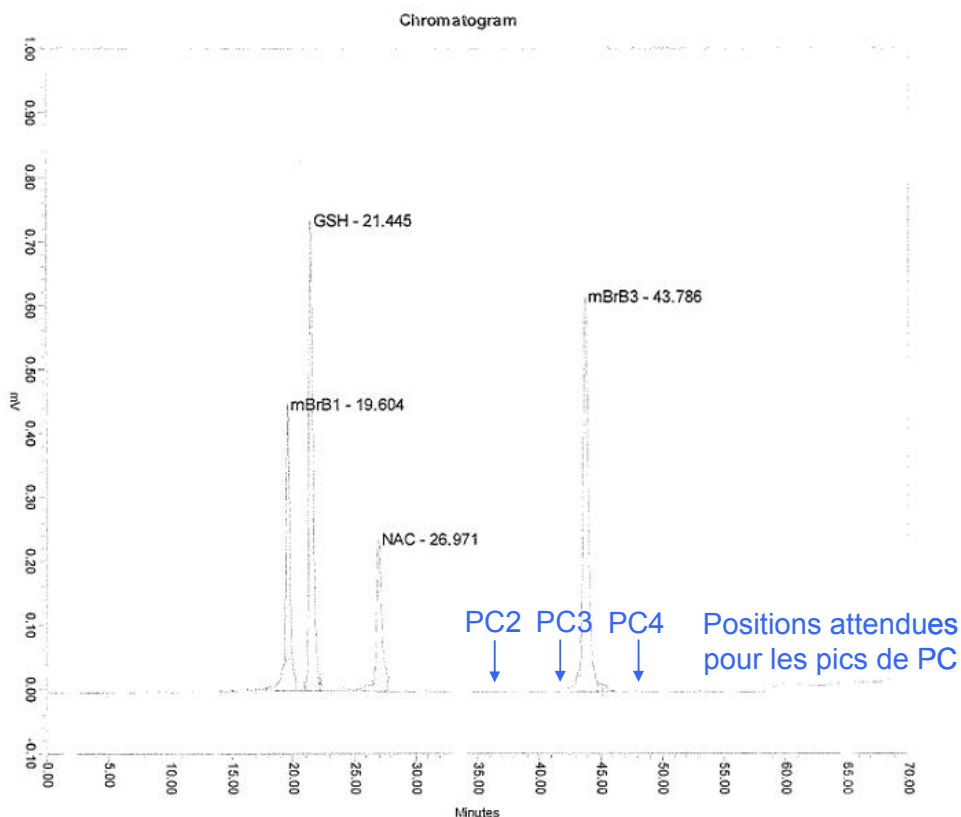


Figure III-14: Chromatogramme obtenu pour un échantillon d'*A. halleri* d'origine N-MET ayant été cultivé pendant 9 semaines sur solution hydroponique contenant 0  $\mu$ M de Cd et 30  $\mu$ M de Zn. On distingue les pics du glutathion (GSH), du réactif fluorescent monobromébiame (mBrB1, mBrB2) et du N-acétylcystéine (NAC – nécessaire pour la calibration). Les flèches bleues mentionnent la position attendue pour les pics de phytochélatines.

### III.2.2.3.2. Concentrations en glutathion

Les concentrations en GSH sont obtenues aussi à partir du chromatogramme. La figure III-15 présente les concentrations en GSH mesurées pour les différents échantillons d'*A. halleri* MET pour 4, 14 jours, 3 et 9 semaines d'exposition aux différentes concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique.

En l'absence de Cd et pour 30  $\mu\text{M}$  de Zn dans la solution hydroponique (condition « témoin »), il ne semble pas y avoir de différence très nette entre les teneurs en GSH mesurées aux 4 temps d'exposition (Fig. III-15). Il ne semble pas non plus y avoir de différence entre les concentrations en GSH mesurées dans les feuilles de *A. halleri* MET après 4 jours et 14 jours de culture, quelles que soient les concentrations en Cd et Zn dans la solution. Par contre, pour les conditions de culture  $\text{C}_{0-300}$  et  $\text{C}_{20-30}$ , une tendance à l'augmentation des concentrations en GSH en fonction du temps d'exposition est observée dans les feuilles des plantes MET (Fig. III-15). Mais cette tendance ne se vérifie pas pour les plantes exposées pendant 9 semaines. Pourtant, on aurait pu s'attendre à une éventuelle augmentation ou l'apparition d'un palier. Mais aucune tendance nette n'est observée.

De plus, pour un temps d'exposition donné, les teneurs en GSH mesurées dans les plantes ayant poussé sur les solutions hydroponiques enrichies en Cd ne sont pas significativement différentes de celles mesurées pour les plantes « témoin » (Fig. III-15). Ni la présence de Cd dans la solution hydroponique, ni celle du Zn ne semble influencer la concentration en GSH.

A la vue des concentrations en GSH pour les différents temps de culture et quelles que soient les concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique, aucune grande tendance d'évolution des concentrations en GSH ne semble se profiler.

Les concentrations en GSH mesurées dans les parties aériennes d'*A. halleri* d'origine MET varient de 0.01 à 0.5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  par gramme de feuilles fraîches pour tous les temps de culture (4 et 14j, 3 et 9 semaines – Fig. III-15). Les dosages réalisés par Wojcik et al. (2005) dans les feuilles de *Thlaspi caerulescens* d'origine MET cultivée pendant 14 jours sur 0 et 500  $\mu\text{M}$  de Cd dans la solution hydroponique, ont rapporté des concentrations en GSH variant de 0.35  $\mu\text{mol g}^{-1}$  poids frais en présence de 0  $\mu\text{M}$  Cd à 0.2  $\mu\text{mol g}^{-1}$  poids frais en présence de 500  $\mu\text{M}$  de Cd.

### Concentrations en GSH ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) dans les feuilles fraîches d'*A. halleri* MET

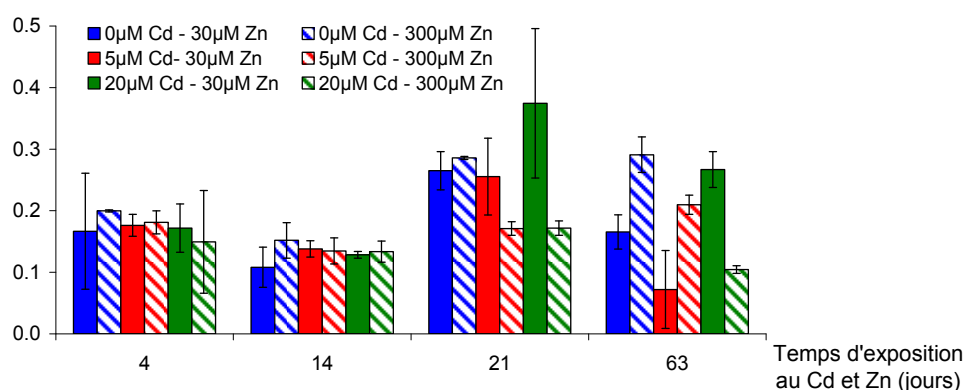


Figure III-15: Concentrations en glutathion (GSH -  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) mesurées dans les parties aériennes d'*A. halleri* MET à différents temps d'exposition (4 et 14 jours, 3 et 9 semaines) pour les différentes concentrations en Cd et Zn testées : 0  $\mu\text{M}$  Cd (bleu), 5  $\mu\text{M}$  Cd (rouge), 20  $\mu\text{M}$  Cd (vert), 30  $\mu\text{M}$  Zn (plein) et 300  $\mu\text{M}$  Zn (hachuré). Les moyennes et les écart-types sont réalisées sur 3 clones.

La figure III-16 présente les teneurs en GSH mesurées dans les plantes MET et N-MET pour 3 et 9 semaines d'exposition aux différentes doses de Cd et Zn. Les teneurs en GSH dans les parties aériennes des plantes MET et N-MET ne sont significativement pas différentes quel que soit le temps d'exposition et quelles que soient les concentrations en Cd et en Zn dans la solution hydroponique. Il n'y a donc pas d'*effet origine* sur les teneurs en GSH.

### Concentration en GSH ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) dans les feuilles fraîches d'*A. halleri* MET et N-MET

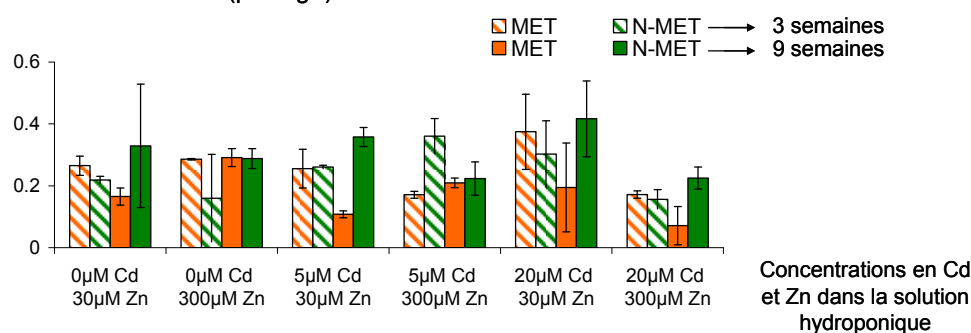


Figure III-16: Concentrations en glutathion (GSH -  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) mesurées dans les parties aériennes d'*A. halleri* MET (orange) et N-MET (vert) après 3 semaines (hachuré) et 9 semaines (plein) pour les différentes concentrations en Cd et Zn dans la solution hydroponique testées. Les moyennes et les écart-types sont réalisées sur 3 clones.

### III.2.2.3.3. Accumulation du Cd et teneurs en GSH dans les parties aériennes d'*A. halleri*.

La figure III-17 présente le diagramme de corrélation des teneurs en GSH et des teneurs en métaux dans les parties aériennes d'*A. halleri* pour les 2 origines cultivées pour différentes durées sur différentes concentrations en Cd et Zn dans la solutions. Il n'y a pas de corrélation entre les teneurs en GSH et les teneurs en Cd et Zn (Cd :  $R^2 = 0.031$  ; Zn :  $R^2 = 0.013$ ,  $P < 0.05$ ). L'accumulation du Cd ne semble pas augmenter la « production » de GSH. Il en est de même pour le Zn.

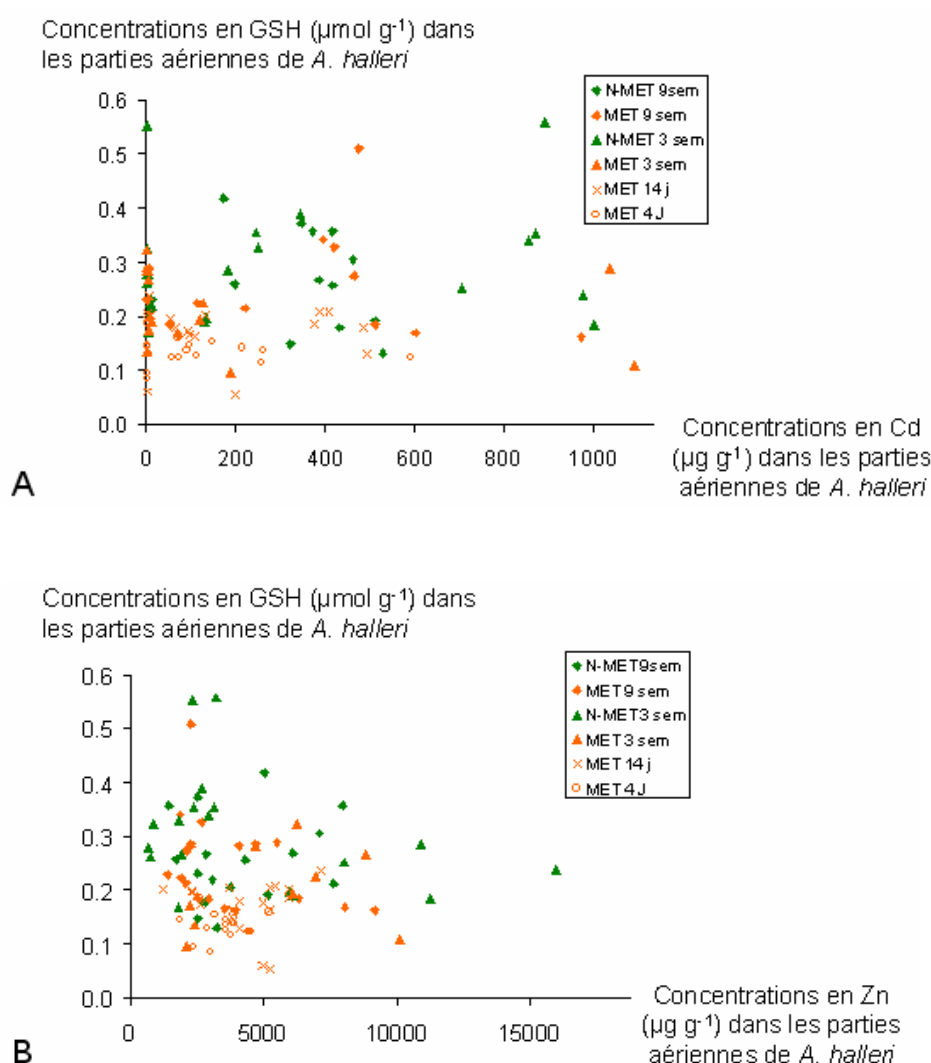


Figure III-17 : Diagramme de corrélation des teneurs en GSH et en Cd (A) ou en Zn (B) dans les parties aériennes d'*A. halleri* d'origine MET (orange) et N-MET (vert) pour les différents temps d'exposition aux concentrations en Cd et Zn en solution hydroponique ( $\diamond$ , 9 semaines ;  $\Delta$ , 3 semaines ;  $\times$ , 14 jours ;  $\circ$ , 4 jours)

### III.2.3. Discussion

L'analyse EXAFS nous a permis de décrire la composition de la première couche de coordination du Cd dans les feuilles d'*A. halleri* pour les 2 origines : elle se compose d'un mélange d'atomes de S et d'O et comprend 6 atomes au total. Les distances interatomiques Cd-O et Cd-S, sont respectivement de 2,31 et 2,53 Å. Les paramètres structuraux trouvés suggèrent la présence de ligands S et O. En revanche, il nous est difficile d'attribuer la provenance moléculaire de ces ligands. Le ligand S peut provenir soit de la cystéine, soit du glutathion, et le ligand O peut provenir de molécules présentes dans les vacuoles (malate, citrate, ...) ou dans les parois cellulaires (pectine, cellulose, ...)

De la Rosa et al. (2004) ont trouvé la même distance interatomique pour la liaison Cd-S dans les feuilles de *S. kali*, en revanche, ils ont trouvé que l'atome d'O est à 2,14 Å et ont mis en évidence la présence de liaisons Cd-Cd à 2,96 Å. Ces derniers ont conclu que la présence de Cd-S dans les feuilles de la plante suggère la formation de complexes Cd-PC. Salt et al. (1995), qui ont étudié les différents complexes formés avec le Cd dans la moutarde indienne, *B. juncea*, ont montré que le Cd présent sous la forme d'un complexe Cd-PC contient 4 ligands S, alors que dans la sève du xylème, le Cd est coordonné à 6 ligands O/N. Dans notre cas, le nombre maximum d'atomes de S trouvés sur la première couche est de 2,3 ; le mélange de ligands S et O est observé, mais les atomes d'O sont toujours majoritaires. Les travaux de Kupper *et al* (2004) sur les feuilles de *Thlaspi caerulescens* d'origine métallicole, cultivées en hydroponie pendant 6 mois en présence de Cd (100 ou 50 µM) et de Zn (10 µM), ont aussi mis en évidence la présence de Cd-S et Cd-O/N pour des distances interatomiques respectives de 2,51 et 2,28 Å, ce qui est concordant avec nos résultats.

Au cours de cette étude, Kupper *et al.*, (2004) ont aussi testé l'influence de la concentration en Cd dans la solution hydroponique sur la spéciation du Cd dans les feuilles matures de *Thlaspi caerulescens*. Sur la solution hydroponique contenant 100 µM de Cd, la première couche de coordination du Cd est composée par 1,5 atomes de S et 4,5 atomes de O, attribués aux ligands du Cd suivant : histidine (à 28%), ligands O (à 38%) et ligands S (à 34%). Bien que la composition de la couche

de coordination du Cd présent dans les feuilles de *T. caerulescens* ayant poussé sur 50  $\mu\text{M}$  de Cd soit similaire, les proportions des ligands sont différentes, soit 13% d'histidine, 63 % de ligands O et 24 % de ligands S. La spéciation du Cd dans les feuilles de *T. caerulescens* varie en fonction de la teneur en Cd dans la solution hydroponique. La présence de ligands S augmente avec l'augmentation de la teneur en Cd dans la solution hydroponique. Les teneurs en ligands soufrés dans les feuilles de *T. caerulescens* sont nettement supérieures à celles que nous avons trouvées dans *A. halleri* MET. Cette différence peut s'expliquer soit par la concentration en Cd présent dans la solution hydroponique supérieure à celle que nous avons testé, soit par les différences de mécanismes qu'il existerait entre ces deux hyperaccumulatrices de Cd.

L'étude de la spéciation du Cd dans les feuilles d'âges différents de *Thlaspi caerulescens* cultivé sur 100  $\mu\text{M}$  de Cd et 10  $\mu\text{M}$  de Zn, a montré qu'il n'y avait pas de différence de spéciation du Cd dans les feuilles jeunes et matures, alors que le Cd est sous une forme différente dans les feuilles sénescents (Kupper et al., 2004). En effet, la première couche de coordination du Cd dans ces feuilles sénescents est composée de 0,3 atomes de S et de 5,7 atomes de O. Le Cd est encore majoritairement associé à des ligands O. Kupper et al. (2004) ont travaillé sur une origine métallicole de *Thlaspi caerulescens*. Dans notre étude, pour les *A. halleri* d'origine MET, il n'y a pas de différence de spéciation du Cd entre les feuilles jeunes et les feuilles matures.

Kupper et al. (2004) ont identifié l'espèce Cd-histidine dans chacune des feuilles étudiées. Ces résultats montrent que les auteurs ont été capables de différencier le spectre de Cd-histidine des autres spectres présentant du Cd associé aux ligands N/O, ce qui ne fut pas le cas dans notre étude. En effet, dans notre banque de spectres de références, le spectre de la référence Cd-histidine n'est pas très différent des spectres enregistrés pour les Cd-acides organiques. Il a été rapporté que pour d'autres métaux (Zn, Ni), un phénomène de diffusion multiple se produit au cours du cycle imidazole, ce qui entraîne des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> couches de coordination du métal cible de forte amplitude. Kupper et al. (2004) ont reconnu que ces effets sont faibles pour le Cd, mais les TF de leurs spectres expérimentaux présentent des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> pics plus élevés que les nôtres. De plus, le spectre de Cd-Histidine enregistré par



Kupper *et al.* (2004) n'étant pas illustré dans l'article du même nom, nous ne pouvons pas le comparer avec notre spectre de référence Cd-histidine. Dans notre cas, la quasi absence des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> pics sur les TF permet de dire qu'il n'y a pas de diffusion multiple, et que notre référence Cd-Histidine n'a pas de signature spécifique par rapport aux autres références d'acides aminés et organiques utilisés (références regroupées dans la famille Cd-COOH/OH). Il nous est donc difficile de conclure que le Cd dans les feuilles d'*A. halleri* pour les 2 origines est présent sous la forme de Cd-histidine.

De nombreuses études rapportent que les PC et le GSH jouent un rôle important dans les mécanismes de détoxification des végétaux supérieurs en raison de leurs ligands soufrés susceptibles de complexer le Cd. Le GSH pourrait jouer un rôle dans l'hyperaccumulation en relation avec son activité antioxydante (Verbruggen *et al.* 2009). Le rôle des PC dans l'hyperaccumulation est plus controversé (Verbruggen *et al.* 2009). Les concentrations en GSH mesurées dans les parties aériennes d'*A. halleri* d'origine MET varient de 0,01 à 0,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  pour tous les temps de culture (4 et 14j, 3 et 9 semaines). Ces concentrations sont bien plus faibles que les concentrations en Cd mesurées dans des parties aériennes des plantes MET (0,4 à 9,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$  pour tous les temps de cultures). Donc, le GSH ne peut être considéré comme un ligand majeur du Cd. Il en est de même pour les plantes N-MET.

La plupart des études sur les PC dans les plantes sont réalisées sur les racines, comme par exemple Ben Ammar *et al.* (2008) qui rapporte que le Cd est majoritairement présent sous la forme d'un complexe Cd-PC dans les racines de tomates. Quelques études ont mis en évidence la synthèse de PC dans les parties aériennes. Wojcik *et al.* (2005) ont dosé le GSH et les PC (PC2, 3 et 4) dans les racines et les parties aériennes de *T. caerulescens* après 14 jours d'exposition à des concentrations de Cd variant de 5 à 500  $\mu\text{M}$  en hydroponie. La concentration des PC dans les parties aériennes augmente avec l'augmentation des concentrations dans la solution tandis que la concentration en GSH diminue. Les concentrations maximales en Cd et en PC (> 500nmol SH  $\text{g}^{-1}$  poids frais) dans les parties aériennes de *T. caerulescens* ont été mesurées après 14 jours à 500 $\mu\text{M}$  de Cd. La concentration de GSH varie de 350 nmol SH  $\text{g}^{-1}$  poids frais en présence de 0  $\mu\text{M}$  Cd à 200 nmol SH

$\text{g}^{-1}$  en présence de  $500\mu\text{M}$  de Cd. Malgré la présence de PC dans les racines et les parties aériennes de *T. caerulescens*, les auteurs concluent que les PC n'ont pas de rôle majeur dans la tolérance au Cd chez cette espèce car la réduction de la concentration en PC après addition de BSO n'augmente pas la sensibilité des plantes au Cd. Les PC n'auraient donc pas non plus de rôle dans l'hyperaccumulation du Cd chez cette espèce. Les mêmes conclusions sont tirées par Schat et al. (2002) pour un écotype de *T. caerulescens* hypertolérant au Cd. Par contre, les PC pourraient intervenir dans la tolérance au Cd des écotypes non-métalliques de cette espèce. La synthèse de PC dans des cellules pourrait mener à une augmentation de l'accumulation du Cd (Clemens et al., 1999). Au contraire, une déficience de la production de PC pourrait conduire à une accumulation réduite du Cd (Howden & Cobbett, 1992; Larsson et al., 2002).

Dans notre étude, nous n'avons pas détecté de PC dans les parties aériennes d'*A. halleri*. En accord avec les résultats pré-cités, nous pouvions faire l'hypothèse que l'exposition au Cd entraînerait une accumulation de PC dans les parties aériennes des plantes MET et N-MET. Nos résultats suggèrent que les PC ne sont pas impliquées dans l'hyperaccumulation du Cd chez *A. halleri*.

Certains travaux de recherche suggèrent que les complexes PC-Cd sont seulement formés transitoirement. Quelques auteurs ont observé une disparition de complexes de PC-métal après plusieurs jours dans des cultures cellulaires et dans des échantillons de plantes provenant de sites riches en métaux (par exemple, mine de cuivre en friche Leopold et al., 1999). D'autres, tels que Salt et al. (1997) ont constaté que le pourcentage de Cd accumulé par *B. juncea* qui est lié aux PC dépend du temps. Après 6 h, 34 % du Cd est présent sous la forme de Cd-S alors qu'après 72h, on en a 60 %. Les ligands pour la complexation du Cd à long terme ne sont pas vraiment connus. Dans notre étude sur *A. halleri* MET, l'accumulation du Cd a été examinée à partir de 4 jours de cultures. Il se peut que nous ayons manqué la phase transitoire de formation des complexes Cd-PC. Certaines études récentes ont démontré le rôle des défensines dans les plantes hyperaccumulatrices. Par exemple, Mirouze et al. (2006) ont suggéré que les défensines, qui sont des petites protéines riches en cystéine et qui pourraient donc être impliquées dans la complexation des métaux, participaient à la tolérance au Zn chez *A. halleri*. Cette hypothèse pourrait sous-tendre que le mécanisme de tolérance au Zn serait la chélation du Zn par les

défensines. Cette hypothèse suppose cependant la régulation du statut redox de la protéine pour permettre la complexation du métal. Les défensines ne semblent cependant pas conférer de tolérance au Cd.

Les acides organiques et quelques acides aminés, particulièrement l'histidine et la cystéine, jouent aussi un rôle dans la chélation d'ions métalliques aussi bien à l'intérieur des cellules que dans la sève du xylème (par exemple : Ni-citrate ou Ni-histidine, Kramer et al., 2000). Par exemple, Sarret et al. (2009) ont montré que le Zn était associé à des groupements carboxyles et/ou hydroxyles dans les cellules du mésophylle des feuilles d'*A. halleri*. Les acides carboxyliques sont considérés comme étant des ligands potentiels pour le transport de Cd à travers le xylème et pour la séquestration métallique vacuolaire. Sun et al (2006) ont montré que l'accumulation du Cd était en relation avec les acides organiques (acides acétique et citrique) présents dans les feuilles de *Solanum nigrum*. L'une de leur conclusion est que l'hyperaccumulation du Cd dans cette plante est étroitement liée à ces acides organiques. Cette corrélation est aussi observée chez *Thlaspi caerulescens* : les résultats de quelques études ont suggéré que pour de faibles concentrations en Cd dans les feuilles, les acides citriques sont les ligands majeurs du Cd (Wagner et al., 1993; Clemens et al., 2001; Wojcik et al., 2005). Ueno et al., (2005) ont mis en évidence par RMN du  $^{113}\text{Cd}$  la présence de complexe Cd-malate à l'intérieur des vacuoles des cellules de *Thlaspi caerulescens*, et le dosage de cet acide organique montre que les concentrations en malate ne sont pas affectées par l'augmentation de la concentration en Cd dans les feuilles. La synthèse du malate n'induit pas l'accumulation du Cd. Kupper et al. (2004) ont suggéré que la présence de Cd-acides organiques serait en lien avec le mécanisme de séquestration vacuolaire (mécanisme typique des plantes hyperaccumulatrices), alors que la présence de ligands S et/ou d'histidine serait impliquée dans le mécanisme de détoxification (mécanisme typique des non accumulatrices, par ligands forts dans le cytoplasme). Dans notre étude, la base de données des références CdCOOH/OH ne permet pas de distinguer d'une part les complexes Cd-acides organiques classiquement présents dans les vacuoles de ceux présents dans les parois, et d'autre part, les complexes Cd-acides organiques et Cd-acides aminés. De plus, les spectres des références Cd-pectine, Cd-cellulose, Cd-paroi ne sont pas très différents entre eux. On ne peut donc pas conclure sur le lieu préférentiel de stockage du Cd à l'échelle cellulaire de

la feuille. Le Cd peut se trouver dans les vacuoles, dans les cellules de l'épiderme, dans les cellules du mésophylle, dans le xylème, dans l'apoplasme, le cytosol etc...

## **Conclusion générale**



## CONCLUSION GENERALE

Ce projet de thèse visait à mieux comprendre les mécanismes d'accumulation du Cd chez *A. halleri* et l'impact de sa culture sur un sédiment de curage contaminé. Ce projet s'articulait autour des questions suivantes:

### **(1) Comment se comporte *A. halleri* sur un sédiment de curage contaminé par le Cd et le Zn ? Quel est l'impact d'*A. halleri* sur la biodisponibilité et la spéciation du Cd dans ce sédiment ?**

Pour répondre à ces interrogations, nous avons mis en place une expérience de culture d'*A. halleri*, en pot et en conditions contrôlées sur une durée de 5 mois. Des plantes d'origine métallicole (MET) et non métallicole (N-MET) ont été cultivées sur un sédiment contaminé séché et homogénéisé. Nos objectifs consistaient à :

- (i) identifier la spéciation du Cd et quantifier les formes physico-chimiques présentes dans le sédiment avant et après culture en vue de formuler des hypothèses quant à sa mobilité et à sa possible évolution dans un sédiment végétalisé.
- (ii) déterminer au travers d'un suivi expérimental l'évolution des pools échangeable et phytodisponible du Cd au cours de la culture.
- (ii) établir un bilan de la répartition du Cd dans les différents compartiments lixiviables, matrice solide et plante.

### **(2) Où se distribue le Cd chez *A. halleri* et sous quelle forme chimique ? Quels sont les mécanismes de stockage du Cd dans la plante en précisant le rôle des différents ligands possibles tout en tenant compte de la compétition entre les différents polluants métalliques, en particulier le Zn qui est également hyperaccumulé par *A. halleri* ? Y a-t-il une différence entre les plantes d'origine MET et N-MET et entre feuilles jeunes et matures ?**

Pour répondre à cette nouvelle série d'interrogations, nous avons mis en œuvre une expérience en hydroponie, où des plantes d'origine MET et N-MET ont été exposées à des concentrations croissantes de Cd et de Zn. Nos objectifs consistaient à :

- (i) localiser les sites de stockage du Cd à l'échelle de la rosette et de la feuille et quantifier la distribution du Cd dans ces compartiments.

- (ii) déterminer la spéciation du Cd dans les feuilles de *A. halleri* en vue de formuler des hypothèses sur les lieux de stockage du Cd à l'échelle cellulaire.
- (iii) mettre en relation ces informations avec les concentrations en Cd et en Zn mesurées dans les parties aériennes des plantes.

Pour mener ce travail à bien, nous avons utilisé des approches physique, physico-chimique et physiologique. Nous avons travaillé sur des matrices (le sédiment, les lixiviats et la plante) et à des échelles variées (la plante entière, l'organe, ainsi que le sédiment et ses différentes fractions granulométriques et agrégats microscopiques à l'échelle globale, et à l'échelle moléculaire). Nous avons aussi mis en œuvre des outils de pointe tels que les techniques sur synchrotron et variés tels que l'autoradiographie et la chimie analytique.

Le Cd présent dans le sédiment avant culture est présent majoritairement sous forme d'un sulfure métallique mixte bien cristallisé contenant environ 2/3 de Zn et 1/3 Cd et des traces de Fe. A l'échelle microscopique, ces sulfures métalliques présents dans le sédiment présentent des proportions variables en Zn et Fe et Cd car des rapports Cd/Zn et Cd/Fe très différents peuvent exister. En revanche, aucune association du Cd avec des oxydes de fer n'a été mise en évidence dans le sédiment avant culture.

Après culture, le Cd contenu dans le sédiment est essentiellement associé à des acides organiques et à des phosphates. Ponctuellement, du Cd associé à des sulfures est observé, mais cela ne représente qu'une phase très minoritaire à l'échelle globale. Le sulfure mixte de Zn, Cd et Fe identifié avant la mise en culture a été presque totalement oxydé, et ce, même en absence de plantes. Ceci suggère une plus grande sensibilité à l'oxydation pour le sulfure mixte.

Cette oxydation pourrait être en partie expliquée par les cycles de séchages humidifications (arrosage) auxquels sont soumis tous les pots, végétalisés et non végétalisés. La présence de plantes, qu'elles soient d'origine MET ou N-MET, semble favoriser ce processus.

Par comparaison avec le sédiment initial avant culture, l'oxydation des sulfures semble avoir entraîné la libération du Cd et de nouvelles espèces se sont formées : Cd-acides organiques, Cd-phosphates. Etant donné que les sédiments étudiés étaient initialement



riches en matière organique, nous avons émis l'hypothèse qu'une partie des métaux puissent être complexée avec des substances humiques qui composent la matière organique du sédiment. Là encore, aucune association du Cd avec des oxydes de fer n'a été mise en évidence ; il conviendrait d'infirmer ou de confirmer leur absence en utilisant des références moins concentrées en Cd pour la reconstruction des spectres.

La culture d'*A. halleri* a donc un impact certain sur la spéciation du Cd dans le sédiment. En revanche, la culture des plantes MET et N-MET n'a d'influence ni sur la fraction échangeable ni sur le pool phytodisponible en Cd. Quelle que soit leur origine, un effet des plantes est observé sur la fraction échangeable en Zn et se traduit par une diminution du pool échangeable en Zn. Dans une moindre mesure, cette tendance est aussi observée pour le pool phytodisponible en Zn.

L'impact de la culture d'*A. halleri* est aussi observé sur les concentrations en Cd mesurées dans les lixiviats. En effet, les plantes MET et N-MET ont diminué ces concentrations. La quantité de Cd entraîné dans les lixiviats est faible en comparaison des teneurs totales en Cd du sédiment. Après 5 mois de culture, d'arrosage et de lixiviations mensuelles, la quantité de Cd lixivié est de 0.01% du Cd total.

Les plantes se développant sur ce substrat ont accumulé de fortes quantités en Cd dès le premier mois de culture. La comparaison de deux modes de culture (l'une sur sédiment, l'autre sur solution hydroponique) nous a permis de conclure que la phytodisponibilité des métaux joue un rôle primordial dans l'accumulation du Cd dans les parties aériennes. En culture hydroponique, où le Cd est beaucoup plus phytodisponible que dans le sédiment, par exemple les teneurs dans les parties aériennes d'*A. halleri* cultivées en hydroponie sur 20µM de Cd sont 100 fois supérieures à celles mesurées dans les parties aériennes des plantes cultivées sur sédiment.

L'accumulation du Cd dans les parties aériennes n'est pas affectée par la présence du Zn, que ce soit lors des cultures en hydroponie (sauf dans un cas). La présence de Zn n'affecte pas non plus la distribution du Cd dans les feuilles de la rosette d'*A. halleri* cultivée en solution hydroponique. Le Cd est stocké dans les tissus des feuilles d'*A. halleri* et très minoritairement dans les trichomes, sans distinction entre les feuilles jeunes et les feuilles matures. Après 9 semaines de culture en hydroponie, les tissus en périphérie de feuille sont particulièrement enrichis en Cd.

L'étude de la spéciation du Cd dans les feuilles d'*A. halleri* montre que le Cd est principalement lié à des atomes d'O et minoritairement par des atomes de S. Les ligands S ne proviennent pas des phytochélatines. Quelle que soit l'origine d'*A. halleri*, nous n'avons pas mesuré de PC dans les parties aériennes des plantes. Il ne nous a pas été possible de déterminer avec précision quels sont les acides organiques mis en jeu dans la complexation du Cd ; de ce fait il nous est impossible de déterminer le compartiment cellulaire de stockage du Cd au sein de la feuille. L'analyse des acides organiques et acides aminés présents dans les feuilles d'*A. halleri* doit être envisagée afin de confirmer les résultats récents obtenus par d'autres auteurs montrant que le Cd est séquestré dans la vacuole, auquel le Cd serait associé à un mélange d'acides organiques, ou, par exemple, que le Cd est stocké dans les parois cellulaires ou le cytosol ou l'apoplasme sous forme d'un complexe Cd-acides aminés. Afin de lever tous les doutes sur la spéciation du Cd dans les vacuoles, une expérience d'isolement des vacuoles pourrait être réalisée : une fois les vacuoles concentrées, les analyses de dosage et spectroscopiques renseigneraient sur la spéciation et la teneur en Cd dans ce compartiment.

L'une des originalité de ce travail de thèse était de comparer *A. halleri* de deux origines : métallicole et non-métallicole pour tous les paramètres étudiés. Les plantes des deux origines ont un comportement similaire : les plantes MET et N-MET ont le même impact sur la spéciation et la biodisponibilité du Cd présent dans le sédiment de curage étudié, ainsi que sur les quantités de Cd lixivié. Les deux génotypes de plantes accumulent préférentiellement le Cd dans les tissus des feuilles et dans une moindre mesure dans les trichomes. Cependant, quelques observations sont remarquables.

Tout d'abord, lors de la culture en pot sur sédiment, bien que les plantes des deux origines se soient développées sur le sédiment fortement contaminé, une différence de croissance est observée : les plantes N-MET ont produit moins de biomasse que les MET. En revanche, les plantes MET et N-MET ont accumulé autant de Cd dans leurs parties aériennes, malgré une production de biomasse différente. Nous avons aussi observé que les plantes N-MET accumulaient plus de Zn. Bien que ce travail de thèse ne soit pas un test pour la phytoextraction du Cd (le substrat de culture étant beaucoup trop contaminé), les plantes MET semblent plus appropriées pour une éventuelle application car elles fournissent plus de biomasse, et ont un rendement d'extraction supérieur à celui mesuré pour les plantes N-MET. De plus, les rendements d'extraction pourraient

s'améliorer si les teneurs en Cd dans le substrat étaient plus faibles. L'état de l'art des rendements d'extraction du Cd obtenus par l'utilisation des plantes hyperaccumulatrices, et par celle de plantes non-accumulatrices développant de fortes biomasses montrent qu'aucune des deux méthodes n'est encore satisfaisante. Dans les deux cas, cela nécessite de nouvelles investigations, comme par exemple, une expérience de culture en champ de *A. halleri*.

L'autre différence remarquable entre les plantes MET et les plantes N-MET réside dans la teneur en ligand S dans les feuilles des plantes. La plus grande proportion de ligands S a été mesurée pour les plantes d'origine N-MET, plantes qui sont *a priori* moins tolérantes que les plantes MET. La présence de ligands S pourrait être un indicateur du degré de stress de la plante. Cette différence de spéciation pourrait être le reflet de mécanismes différents pour l'hyperaccumulation du Cd (séquestration vacuolaire, détoxification par chélation) et de lieux de stockage sub-cellulaires différents (vacuoles, parois cellulaires...) pour les plantes MET et les plantes MET.

En conclusion, ce travail de thèse a permis d'accroître les connaissances concernant l'accumulation du Cd chez l'hyperaccumulatrice *Arabidopsis halleri*, mais les mécanismes n'ont pas été encore clairement mis en évidence. Pour cela, de nouvelles investigations, notamment sur la spéciation dans les parties aériennes, mais aussi dans les racines, à l'échelle cellulaire et subcellulaire sont requises. Ainsi, couplées aux travaux menés en génétique, les futures études pourront aboutir à la compréhension des mécanismes d'hyperaccumulation du Cd dans cette plante.



## Références bibliographiques



- Adler E. 2001. Boues d'épuration et métaux lourds : éléments d'information.
- Adriano DC. 1986. *Trace elements in the terrestrial environment*, New-York.
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry. Bioavailability and Risks of Metals. Springer-Verlag, New York.
- Ager F, Ynsa M, Dominguez-Solis J, Gotor C, Respaldiza M, Romero L. 2002. Cadmium localization and quantification in the plant *Arabidopsis thaliana* using micro-PIXE. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 189, 494-498.
- Agostini R., Pavageau P., Verley F. Curage et devenir des boues, approche réglementaire. [en ligne], 2001, 66 p. Disponible sur : <http://www.eau-artoispicardie.fr/>.
- Alary, C. 2001. Technical report Douai - Fr., CNRS: 72.
- Alary C, Demougeot-Renard H. 2008. *Fate of pollutant load in a small canalised river (Scarpe, North of France) : understanding the spatial distribution of heavy metals in sediments using factorial kriging analysis*. Paper presented at the International Symposium on Sediment Management, Lille, Fr.
- Alloway, B.J. 1995. The origin of heavy metals in soils. In: Heavy metals in soils. B.J. Alloway. New York, Chapman & Hall: 38-57.
- Alloway, B.J. 1995. Cadmium. In: Heavy metals in soils. B.J. Alloway. New York, Chapman & Hall: 122-151.
- Almås A.R., Lombnæs P., Sogn T.A., Mulder J. 2006. Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake by spinach and ryegrass. *Chemosphere*, Vol.62, Issue 10, 1647-1655
- Amir S., Hafidi M., Merlina G. and Revel J.-C. 2005, Sequential extraction of heavy metals during composting of sewage sludge. *Chemosphere*, 59, 801-810.
- Andrade J. C. M., Mahler C. F., Oliveira J. A. 2002. Soil Phytoremediation.
- Antonovics, J. 1971. The effects of a heterogeneous environment on the genetics of natural populations. *American Scientist* 59: 593-599.
- Assuncao AGL, Schat H, Aarts MGM. 2003. *Thlaspi caerulescens*, an attractive model species to study heavy metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 159, 351-360.
- Assuncao AGL, Ten Bookum WM, Nelissen HJM, Vooijs R, Schat H, Ernst WHO. 2003. A cosegregation analysis of zinc (Zn) accumulation and Zn tolerance in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 159, 383-390.
- Aten C. F. and Gupta S. K. 1996. On heavy metals in soil; rationalization of extractions by dilute salt solutions, comparison of the extracted concentrations with uptake by ryegrass and lettuce, and the possible influence of pyrophosphate on plant uptake. *The Science of the Total Environment*, 178, 45-53.
- Audry S., Blanc G. and Schäfer J. 2005. The impact of sulphide oxidation on dissolved metal (Cd, Zn, Cu, Cr, Co, Ni, U) inputs into the Lot-Garonne fluvial system (France). *Applied Geochemistry*, 20, 919-931.
- Ayati M. and Madsen H.E.L. 2000. Crystallization of some heavy-metal phosphates alone and in the presence of calcium ion, *J. Cryst. Growth* 208, pp. 579-591.

- Bäckström M., Dario M., Karlsson S. and Allard B. 2003, Effects of a fulvic acid on the adsorption of mercury and cadmium on goethite. *The Science of the Total Environment*, 304, 257-268.
- Bailey E. H., Mosselmans F. W. and Young S. D. 2005. Time-dependent surface reactivity of Cd sorbed on calcite, hydroxylapatite and humic acid. *Mineralogical Magazine*, Vol. 69(5), pp. 563-575
- Baize D. 1997 Teneurs Totales en Eléments Traces Métalliques dans les Sols Français. In: Références et Stratégies d'Interprétation, INRA Editions, Paris, France.
- Baize D. 2002. *Examen critique des valeurs limites "sols" de la réglementation française*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 137-154. (Un point sur...).
- Baize D. and Roddier S. 2002. *Approche typologique d'une cartographie pédogéochimique. Exemple de l'Avallonnais*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 123-134. (Un point sur...).
- Baker, A.J.M. 1981. Accumulators and excluders - strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643.
- Baker AJM, Brooks RR. 1989. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements-A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1, 81-126.
- Baker, A.J.M., S.P. McGrath, C.M.D. Sidoli and R.D. Reeves 1994. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metalaccumulating plants. *Resources Conserv. Recycl.* 11: 41-49.
- Baker, A.J.M., R.D. Reeves and A.S.M. Hajar. 1994. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytol.* 127: 61-68.
- Bani A, Echevarria G, Sulçe S, Morel J-L, Mullai A. 2007. In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant Soil* 273:79-89
- Barcelo J, Poschenrieder C. 2003. Phytoremediation: principles and perspectives. *Contributions to Science* 2, 333-344.
- Bécart D, Pavageau P, Vivant D. 1997. Suivi de la qualité des sédiments, bilan de synthèse des analyses effectuées entre 1994 et 1997. *Voies Navigables de France, Douai - Fr*, pp.170
- Becher M, Talke IN, Krall L, Kramer U. 2004. Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Journal*, 37, 251-268.
- Begonia, G.B., C.D. Davis, M.F.T. Begonia and C.N. Gray. 1998. Growth responses of Indian mustard (*Brassica Juncea* (L.) Czern.) and its phytoextraction of lead from a contaminated soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 61: 38-43.
- Beltrami M., Rossi D. and Baudo R. 1999. Phytotoxicity assessment of lake Orta sediments. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 2, 391-401.



- Ben Ammar W., Mediouni C., Tray B., Ghorbel M.H. and Jemal F. 2008. Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. *Biologica Plantarum* 52 (2): 314-320
- Benner S. G., Blowes D. W., Herbert R. B., et Ptacek C. J. 1999. Geochemistry of a permeable reactive barrier for metals and acid mine drainage. *Environ. Sci. Technol.* 33, 2793-2799.
- Bercquet A. 2008. *Valorisation de la biomasse végétale contaminée par le zinc et le cadmium: compostage et extraction des métaux par les microorganismes* (Master Pro No.). INERIS.
- Bermond A. 1999. Caractérisation chimique de la spéciation des métaux traces dans les sols. In *spéciation des métaux dans le sol*, pp. 73-95. Publications Ecrin, Paris, France.
- Bermond A. 2002. *Examens critique des protocoles d'extractions séquentielles*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 423-434. (Un point sur...).
- Bermond A, Varrault G, Sappin Didier V, Mench M. 2005. A kinetic approach to predict soil trace metal bioavailability: preliminary results. *Plant and Soil*, 275, 21-29.
- Berner R. A. 1981. A new classification of sedimentary environment. *J. Sed. Petrol.* 51, 359-365.
- Bert V. and Deram A. 1999. *Guide des phytotechnologies*. Environnement et développement alternatif. Comines: Tanghe Printing, 154 p.
- Bert V, Macnair MR, De Laguerie P, Saumitou-Laprade P, Petit D. 2000. Zinc tolerance and accumulation in metallicolous populations of *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *New Phytologist*, 146, 225-233.
- Bert V, Bonnin I, Saumitou Laprade P, de Laguerie P, Petit D. 2002. Do *Arabidopsis halleri* from nonmetallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? *New Phytologist*, 155, 47-57.
- Bert V, Meerts P, Saumitou Laprade P, Salis P, Gruber W, Verbruggen N. 2003. Genetic basis of Cd tolerance and hyperaccumulation in *Arabidopsis halleri*. *Plant and Soil*, 249, 9-18.
- Bert V., Seuntjens P., Dejonghe W., Lacherez S., Thuy H.T.T., Vandecasteele B. 2009. Phytoremediation as a management option for contaminated sediments in tidal marshes, flood control areas and dredged sediment landfill sites. *Environ Sci Pollut Res*. DOI 10.1007/s11356-009-0205-6
- Berteau I., Martin S. and Vassiliadis A. 1993. Le curage des cours d'eau lorsque les sédiments contiennent des éléments-traces toxiques. *Le courrier de l'environnement de l'INRA*, 20, 27-36.
- Bertrand I., Hinsinger P., Jaillard B., and Arvieu J. C. 1999. Dynamics of phosphorus in the rhizosphere of maize and rape grown on synthetic, phosphated calcite and goethite. *Plant and Soil* 211, 111-119.
- Bigi A., Gazzano M. and Ripamonti A. 1986. "Thermal stability of cadmium-calcium hydroxyapatite solid solutions". *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*: 241-244.
- Billon G. 2001. *Géochimie des Métaux et du Soufre dans les Sédiments des Estuaires de la Seine et de l'Authie*. Thèse de doctorat, USTL, Lille, 2001, 200p.

- Bolan NS, Adriano DC, Naidu R. 2003. Role of phosphorus in (im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 177*, VOL 177, 1-44.
- Boisset M.-C. 1996. *Données épidémiologiques sur l'exposition environnementale au cadmium*. In: CSHPF. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Tec et Doc. Paris: Lavoisier, pp. 236.
- Boisset M.-C. 1996. *Effets toxiques majeurs du cadmium chez l'animal et l'homme*. In: CSHPF. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Tec et Doc. Paris: Lavoisier, 1996, pp. 236.
- Boisset M.-C. and Narbonne J. F. 1996. *Effets subcellulaires et systèmes sensibles*. In: CSHPF. Plomb, Cadmium et Mercure dans l'alimentation: évaluation et gestion du risque. Tec et Doc. Paris: Lavoisier, 1996, pp. 236.
- Borodin V.L., Lyuin V.L., Iluukhin V.V. and Belov N.V. 1979. Isomorphous calcite-otavite series. *Sov. Phys. Dokl.* 24 pp. 226–227.
- Bortone G, Arevalo E, deibel I, Detzner HD, de Propriis L, Elskens F, Giordano A, Hakstege P, Hamer K, Harmsen J, Hauge A, Palumbo L, van Veen J. 2004. Sediment and dredged material treatment. *J Soils Sediments* 4(4):225–232
- Bostick B. C., Fendorf S. and Fendorf M. 2000. Disulfide disproportionation and CdS formation upon cadmium sorption on FeS<sub>2</sub>. *Geochimica and cosmochimica acta*, 64, 2, 247-255.
- Bostick BC, Hansel CM, La Force MJ, Fendorf S. 2001. Seasonal fluctuations in zinc speciation within a contaminated wetland. *Environmental Science and Technology*, 35, 3823-3829.
- Bourg A. C. M. 1988. *Metals in Aquatic and Terrestrial Systems: Sorption, Speciation and Mobilization*. In: W. Salomons and U. Förstner. Chemistry and Biology of Solid Waste: Dredged Material Mine Tailings. Berlin: Springer-Verlag, 1988, pp. 3-32.
- Bournonville B., Nzihou A., Sharrock P., Depelsenaire G. 2004, Stabilisation of heavy metal containing dusts by reaction with phosphoric acid: study of the reactivity of fly ash. *Journal of Hazardous Materials*, B116, pp. 65-74.
- Bravin MN, Michaud AM and Hinsinger P. 2008. A RHIZOtest to account for the impact of root-induced changes in the rhizosphere on metal bioavailability to plants: a case study with durum wheat cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. Eurosoil 2008, 25-29 August 2008, Vienna, Austria.
- Brewer, E.P., J.A. Saunders, J.S. Angle, R.L. Chaney and M.S. McIntosh. 1999. Somatic hybridization between the zinc accumulator *Thlaspi caerulescens* and *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 761-771.
- Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Maugel TK, Erbe EF, Murphy CA. 2004. Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes. *Environmental Science and Technology*, 38, 5797-5802.
- Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko I, Lux A. 2007. Zinc in plants. *New Phytologist*, 173, 677-702.
- Brooks RR 1998. Phytochemistry of hyperaccumulators. In: *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals* (ed R.R. Brooks), pp. 15-53. CAB International, New York.

- Brown G. E., Calas G., Waychunas G. A., et Petiau J. 1988. X-ray absorption spectroscopy and its applications in mineralogy and geochemistry. In *Review in mineralogy. Spectroscopic methods in mineralogy and geology.*, Vol. 18 (eds. F. C. Hawthorne), pp. 431-512. Mineralogical Society of America, Washington.
- Brune A., Frenzel P. and Cypionka H. 2000. Life at the oxic-anoxic interface : microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 691-710.
- Buatier M, Sobanska S, Elsass F. 2001. TEM-EDX investigation on Zn- and Pb-contaminated soils. *Appl. Geochem.*, 16, 1165-1177.
- Caetano M., Madureira M.-J. and Vale C. 2003. Metal remobilisation during resuspension of anoxic contaminated sediment : short-term laboratory study. *Water, Air, and Soil Pollution*, 143, 23 - 40.
- Caille N, Tiffreau C, Leyval C, Morel JL. 2003. Solubility of metals in an anoxic sediment during prolonged aeration. *Sci. Total Environ.*, 301, 239-250.
- Callahan DL, Baker AJM, Kolev SD, Wedd AG. 2006. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 11, 2-12.
- Calmano W, Hong J, Förstner U. 1993. Binding and mobilization of heavy metals in contaminated sediments affected by pH and redox potential. *Water Sciences and Technology*, 28, 223-235.
- Calmano W and Wellerhauss S. 1982. Dredging of contaminated sediments in the Weser estuary: chemical forms of some heavy metals. *Environmental Technology Letters* 3, 199-208.
- Cambier P. et Mench M., 1998. Contamination des sols par les métaux lourds et autres éléments-traces. In: E. INRA (Editor), *Sol : interface fragile*. Stengel, P., Gelin, S., 161-172.
- Cances B, Juillot F, Morin G, Laperche V, Alvarez L, Proux O, Hazemann JL, Brown GE, Calas G. 2005. XAS evidence of As(V) association with iron oxyhydroxides in a contaminated soil at a former arsenical pesticide processing plant. *Environmental Science and Technology*, 39, 9398-9405.
- Cappuyns V, Swennen R. 2005. Kinetics of element release during combined oxidation and pH(stat) leaching of anoxic river sediments. *Applied Geochemistry*, 20, 1169-1179.
- Carrier P, Baryla A, Havaux M. 2003. Cadmium distribution and microlocalization in oilseed rape (*Brassica napus*) after long-term growth on cadmium-contaminated soil. *Planta*, 216, 939-950.
- Carroll S. A., O'Day P. A., Esser B. and Randall, S. 2002. Speciation and fate of trace metals in estuarine sediments under reduced and oxidized conditions, Seaplane Lagoon, Alameda Naval Air Station (USA). *Geochemical Transactions* 3, 81-101.
- Carroll SA, O'Day P, Piechowski M. 1998. Rock-Water interactions controlling zinc, cadmium, and lead concentrations in surface waters and sediments, US tri-state mining district. 2. Geochemical interpretation. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 956-965.
- Cauwenberg P., Verdonck F., and Maes A. 1998 Flotation as a remediation technique for heavily polluted dredged material. 1. A feasibility study. *Sci. Total Environ.* 209, 113-119.

- Chaignon V. 2001. Biodisponibilité du cuivre dans la rhizosphère de différentes plantes cultivées : cas de sols viticoles contaminés par des fongicides. Thèse. INRA de Montpellier.
- Chaney RL, Ryan JA. 1993. In: *Science and engineering of composting : Design environmental, microbiological and utilization aspect* (ed H.A.J.h.a.H.M. Keener), pp. 451-506.
- Chaney RL, Li YM, Angle J, Baker A, Reeves R, Brown S, Homer F, Malik M, Chin M. 1999. Improving metal-hyperaccumulators wild plants to develop commercial phytoextraction systems: approaches and progress. In: Terry N, Banuelos G (eds) *Phytoremediation of contaminated soil and water*. CRC, Boca Raton, FL.
- Chaney RL, Angle JS et al. 2005. Using hyperaccumulator plants to phytoextract soil Ni and Cd. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a. J Biosci* 60(3-4):190-198
- Chaney RL, Angle JS, Broadhurst CL, Peters CA, Tappero RV, Sparks DL. 2007. Improved understanding of hyperaccumulation yields commercial phytoextraction and phytomining technologies. *Journal of Environmental Quality*, 36, 1429-1443.
- Chardonens, A.N., ten Bookum W.M., Kuijper L.D.J., Verkleij J.A.C. and Ernst W.H.O. 1998. Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. *Physiol. Plant.* 104: 75-80.
- Chardonens AN, ten Bookum WM, Vellinga S, Schat H, Verkleij JAC, Ernst WHO. 1999. Allocation patterns of zinc and cadmium in heavy metal tolerant and sensitive *Silene vulgaris*. *Journal of Plant Physiology*, 155, 778-787.
- Chaudri A. M., Lawlor K., Preston S., Paton G. I., Killham K. and McGrath S. P. 2000. Response of a *Rhizobium*-based luminescence biosensor to Zn and Cu in soil solutions from sewage sludge treated soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 383-388.
- Cho M, Chardonens AN, Dietz KJ. 2003. Differential heavy metal tolerance of *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis thaliana*: a leaf slice test. *New Phytologist*, 158, 287-293.
- Choi YE, Harada E, Wada M, Tsuboi H, Morita Y, Kusano T, Sano H. 2001. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta*, 213, 45-50.
- Christensen TH, Tjell JC. 1984. *Processing and use of sewage sludge*. Paper presented at the Ptoc. 3rd International symposium, Brighton, England.
- Christensen E. R. 1998. Metals, acid-volatile sulfides, organics, and particle distributions of contaminated sediments. *Water Science and Technology* 37(6-7), 149-156.
- Clemens S, Kim EJ, Neumann D, Schroeder JI. 1999. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *Embo J*, 18, 3325-3333.
- Clemens S. 2001. Developing tools for phytoremediation: towards a molecular understanding of plant metal tolerance and accumulation. *Int J Occup Med Environ Health*, 14, 235-239.
- Clemens S. 2006. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, 88, 1707-1719.
- Clozel B., Ruban V., Durand C. and Conil P. (2006). Origin and mobility of heavy metals in contaminated sediments from retention and infiltration ponds. *Applied Geochemistry* 21, 1781-1789

- Cobbett C. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiology*, 123, 825-833.
- Collins C. R., Ragnarsdottir K. V. and Sherman D. M. 1999. Effect of inorganic and organic ligands on the mechanism of cadmium sorption to goethite. *Geochimica and cosmochimica acta*, 63, 19/20, 2989-3002.
- Committee on Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments NRC. 2003. *Bioavailability of Contaminants in Soils and Sediments: Processes, Tools, and Applications*.
- Conder JM, Lanno RP, Basta NT. 2001. Assessment of Metal Availability in Smelter Soil Using Earthworms and Chemical Extractions. *Journal of Environmental Quality* 30, 1231-1237.
- Coquery, M. and Welbourn, P.W. 1995. The relationship between metal concentration and organic matter in sediments and metal concentration in the aquatic macrophyte *Eriocaulon septangulare*. *Water Res.* 29, pp. 2094-2102.
- Cornu J.Y., Denaix L. 2006. DGT ability to predict Zn and Cd phytoavailability for lettuce within an agricultural contaminated site, *Environmental Chemistry* 3, 61-64.
- Cosio C, DeSantis L, Frey B, Diallo S, Keller C. 2005. Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 56, 765-775.
- Cosio C, Vollenweider P, Keller C. 2006. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.) I. Macrolocalization and phytotoxic effects of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 64-74.
- Cotter-Howells J. et Thornton L. 1991. Sources and pathways of environmental lead to children in a Derbyshire mining village. *Environ. Geoch. and health* 13,(2), 127-135.
- Courbot M, Willems G, Motte P, Arvidsson S, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Verbruggen N. 2007. A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis halleri* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiology*, 144, 1052-1065.
- Courchesne F., Savoie S. and Dufresne A. 1995. Effects of air-drying on the measurement of soil pH in acidic forest soils of Quebec, Canada. *Soil science*, 160, 1, 56-68.
- Craciun AR, Courbot M, Bourgis F, Salis P, Saumitou Laprade P, Verbruggen N. 2006. Comparative cDNA-AFLP analysis of Cd-tolerant and -sensitive genotypes derived from crosses between the Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* ssp *petraea*. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2967-2983.
- Crafts AS, Yamaguchi S. 1964. The autoradiography of plant materials. University of California, Division of Agricultural Sciences, Berkley. Manual 35.
- Crannell B.S., Eighmy T.T., Krzanowski J.E., Eusden JR. J.D., Shaw E.L., Francis C.A. 2000. Heavy metal stabilization in municipal solid waste combustion bottomash using soluble phosphate, *Waste Management*, vol. 20, pp. 135-148.
- Crosnier J, Delolme C. 2002. Infiltration de l'eau pluviale : Influence des alternances de dessiccation/réhumectation sur le transfert du zinc en colonnes de sol. *Bulletin des Laboratoires des Ponts et Chaussées*, 240, 53-71.

- Cunningham LM, Collins FW, T.C. Hutchinson. 1975. Physiological and biochemical aspects of cadmium toxicity in soybean. 1. Toxicity symptoms and autoradiographic distribution of cd in roots, stems and leaves Paper presented at the International Conference on Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ont., Canada.
- Cunningham S. D., Berti W. R., and Huang J. W. 1995. Phytoremediation of contaminated soils. *Trends in Biotechnol.* 13, 393-397.
- Cuny D, Denayer FO, de Foucault B, Schumacker R, Colein P, Van Haluwyn C. 2004. Patterns of metal soil contamination and changes in terrestrial cryptogamic communities. *Environmental Pollution*, 129, 289-297.
- D'Amore, J. J., Al-Abed S. R., Scheckel K.G., Ryan J.A. 2005. Methods for speciation of metals in soils: A review. *Journal of Environmental Quality* 34(5): 1707.
- Da Rocha N. C. C., Campos R. C. D., Rossi A. M., Moreira E. L., Barbosa A. D. F. and Moure G. T. 2002. "Cadmium Uptake by Hydroxyapatite Synthetized in Different Conditions and Submitted to Thermal Treatment". *Environmental Science and Technology*, 36: 1630-1635.
- Dahmani-Muller H, Van-Oort F, Gelie B, Balabane M. 2000. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. *Environmental Pollution*, 109, 231-238.
- Dahmani Muller H, van Oort F, Balabane M. 2001. Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grown on an unpolluted soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution*, 114, 77-84.
- Davis A. and Atkins D. 2001. Metal distribution in Clark Fork river sediments. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3501-3506.
- Davis A.P. and Singh I., 1995. Washing of zinc (II) from contaminated soil column. *J. Environ. Engin.*, 121 (2): 174-185.
- Dawson J.J.C., Campbell C.D., Towers W., Cameron C.M. and Paton G.I. 2006. Linking biosensor responses to Cd, Cu and Zn partitioning in soils, *Environmental Pollution* 142, pp. 493–500.
- Degryse F., Broos K., Smolder E. and Merckx R. 2003. Soil solution concentration of Cd and Zn can be predicted with a  $\text{CaCl}_2$  soil extract. *European Journal of Soil Science*, 54, 149-157.
- De la Rosa G, Peralta Videa JR, Montes M, Parsons JG, Cano Aguilera I, Gardea Torresdey JL. 2004. Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere*, 55, 1159-1168.
- Deram A, Denayer F-O, Dubourgier H-C, Douay F, Petit D, Van Haluwyn C. 2007. Zinc and cadmium accumulation among and within populations of the pseudometallophytic species *Arrhenatherum elatius*: Implications for phytoextraction *Science of The Total Environment*, 372, 372-381.
- De Rooij N. M. et Gerrits H. J. 1995. The transport of pollutants from a sludge disposal site. *Europ. Wat. Pollut. Control* 5(5), 43-55.
- DeVolder PS, Brown SL, Hesterberg D, Pandya K. 2003. Metal bioavailability and speciation in a wetland tailings repository amended with biosolids compost, wood ash, and sulfate. *Journal of Environmental Quality*, 32, 851.

- Diaz-Cruz M. S., Lopez de Alda M. J. and Barcelo D. (2003), Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 6, 340-351.
- Di Toppi L, Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41 (2), 105-130.
- Di Toro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Scott K. J., Hicks M. B., Mayrs S. M., et Redmond M. S. 1990. Toxicity of cadmium in sediments : the role of acid-volatile sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1487-1502.
- Diyab C, Juillot F, Dumat C, Morin G, Benedetti M, Mariotti A. 2003. Speciation of lead in contaminated soil under the influence of plants and phosphate amendment type. *Journal De Physique Iv*, 107 Part 1, 381-384.
- Dorioz J. M., Pelletier J. P. and Benoit P. 1998. Propriétés physico-chimiques et biodisponibilité potentielle du phosphore particulaire selon l'origine des sédiments dans un bassin versant du lac Lemman (France). *Water Research*, 32, 2, 275-286.
- Dushenkov S. 2003. Trends in phytoremediation of radionuclides. *Plant and Soil* **249**, 167-175.
- Douay F, Roussel H, Pruvot C, Loriette A, Fourrier H. 2008. Assessment of a remediation technique using the replacement of contaminated soils in kitchen gardens nearby a former lead smelter in Northern France. *Science of The Total Environment*, 401, 29-38.
- Drager DB, Desbrosses-Fonrouge AG, Krach C, Chardonnens AN, Meyer RC, Saumitou-Laprade P, Kramer U. 2004. Two genes encoding Arabidopsis halleri MTP1 metal transport proteins co-segregate with zinc tolerance and account for high MTP1 transcript levels. *Plant Journal*, 39, 425-439.
- Dubois V. 2006. Etude du comportement physico-mécanique et caractérisation environnementale des sédiments marins – Valorisation en technique routière. Thèse de l'Université d'Artois, 2006, 190 p.
- Dubois J.-P., Benitez N., Liebig T., Baudraz M. and Okopnik F. 2002. *Le cadmium dans les sols du haut Jura suisse*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 33-52. (Un point sur...).
- Duchaufour P. 1995. *Pédologie-sol, végétation, environnement*. Paris: Masson, 324 p. (Abrégés).
- Duff M, Hunter D, Triay I, Bertsch P, Reed D, Sutton S, Shea-Mccarthy G, Kitten J, Eng P, Chipera S, Vaniman D. 1999. Mineral associations and average oxidation states of sorbed Pu on tuff. *Environ. Sci. technol.*, 33 (13), 2163-2169.
- Ebbs, S.D. and Kochian L.V. 1997. Toxicity of zinc and copper to Brassica species: implication for phytoremediation. *J. Environ. Qual.* 26: 776-781.
- Ebbs, S.D., M.M. Lasat, J. Brady, J. Cornish, R. Gordon and L.V. Kochian. 1997. Phytoextraction of cadmium and zinc from a contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 26: 1424-1430.
- Echevarria G, More J, Fardeau J, LeclercCessac E. 1998. Assessment of phytoavailability of nickel in soils. *Journal of environmental quality*, pp. 1064-1070.

- Edwards S. C., Macleod C. L. and Lester J. N. 1998. The bioavailability of copper and mercury to the common nettle (*Urtica dioica*) and the earthworm *Eisenia fetida* from contaminated dredged soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 102, 75-90.
- EFSA (Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) - Le cadmium dans l'alimentation - Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire. Rapport 2009.
- Ellis DR, Salt DE. 2003. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 273-279.
- Ernst WHO, Knolle F, Kratz S, Schnug E. 2004. Aspects of ecotoxicology of heavy metals in the Harz region - a guided excursion. *Landbauforschung Volkenrode*, 54, 53-71.
- Ernstberger H., Zhang H., Tye A., Young S. and Davison W. 2005. Desorption kinetics of Cd, Zn, and Ni measured in soils by DGT, *Environ. Sci. Technol.* 39, pp. 1591-1597.
- Fajtl J., Kabrna M., Tichy R., and Ledvina R. 2002. Environmental risks associated with aeration of a freshwater sediment exposed to mine drainage water. *Env. Geology* 41, 563-570.
- Fardeau J. C. 1981. Cinétique de dilution isotopique et phosphore assimilable des sols. Paris: Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 198 p.
- Fardeau J. C., Morel C. and Boniface R. 1991. Cinétiques de transfert des ions phosphate du sol vers la solution du sol: paramètres caractéristiques. *Agronomie*, 11, 787-797.
- Feix I. & Tremel-Schaub A. 2005. Contamination des sols, Transfert des sols vers les plantes, p.9-64
- Feng M.-H., Shan X.-Q., Zhang S.-Z. and Wen B. 2005. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere*, 59, 939-949.
- Fontana S. 1997. Encombrants dépôts... *Hydroplus*, 76, Spécial Pollutec, 84-87.
- Foriel J, Philippot P, Susini J, Dumas P, Somogyi A, Salome M, Khodja H, Menez M, Fouquet Y, Moreira D, Lopez-Garcia P. 2004. High-resolution imaging of sulfur oxidation states, trace elements, and organic molecules distribution in individual microfossils and contemporary microbial filaments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68, 1561-1569.
- Förstner U. and Kersten M. 1988. *Assessment of Metal Mobility in Dredged Material and Mine Waste by Pore Water Chemistry and Solid Speciation*. In: W. Salomons and U. Förstner. Chemistry and biology of solid waste dredged material and mine tailings. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1988, pp. 214-237.
- Francis A. J., Dodge C., Rose A. W., and Ramirez A. J. 1989. Aerobic and anaerobic microbial dissolution of toxic metals from coal wastes: Mechanism of action. *Environ. Sci. Technol.* 23, 435-441.
- Fukuda N, Hokura A, Kitajima N, Terada Y, Saito H, Abed T, Nakai A. 2008. Micro X-ray fluorescence imaging and micro X-ray absorption spectroscopy of cadmium hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri* ssp. *gemmifera*, using high-energy synchrotron radiation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 1068-1075.
- Fung C. N., Zheng G. J., Connell D. W., Zhang X., Wong H. L., Giesy J. P., Fang Z. and Lam P. K. S. 2005. Risks posed by trace organic contaminants in coastal sediments in the Pearl River Delta, China. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 10, 1036-1049.



- Gao Y, Leermakers M, Gabelle C, Divis P, Billon G, Ouddane B, Fischer J-C, Wartel M, Baeyens W. 2006. High-resolution profiles of trace metals in the pore waters of riverine sediment assessed by DET and DGT. *Science of The Total Environment*, 362, 266-277.
- Giller K. E., Witter E. and Mcgrath S. P. 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial precesses in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*, 30, 10/11, 1389-1414.
- Giroux M. 2005. *La prise en compte de la biodisponibilité des contaminants en gestion des matières résiduelles fertilisantes*. In: ADEME. Evaluation des risques pour les écosystèmes - Expériences françaises et québécoises sur la mise en oeuvre des méthodes et des outils, 17 mars 2005, Paris. ADEME, 2005, pp. 67-81.
- Greger M. and Landberg T. 1999, Use of willow in phytoextraction. *International Journal of phytoremediation*, 1, 2, 115-123.
- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamyl-cysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6838–6842
- Hamer K. and Karius V. Brick production with dredged harbour sediments. 2002. An industrial-scale experiment. *Waste Management* , vol. 22, pp. 521–530.
- Hamon RE, Holm PE, Lorenz SE, McGrath SP, Christensen TH. 1999. Metal uptake by plants from sludge-amended soils: caution is required in the plateau interpretation. *Plant and Soil*, 216 (1-2), 53-64.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Kramer U. 2008. Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and triplication of HMA4. *Nature*, 453, 391-NIL\_344.
- Hargé J-C. 1997. *Spéciation comparée du zinc, du plomb et du manganèse dans des sols contaminés*, Joseph Fourier, Grenoble.
- Harada E, Sarret G, Isaure M, Geoffroy N, Fakra S, Marcus M, Birschwilks M, Clemens S, Manceau A, Choi Y. 2006. Detoxification of zinc in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants: Exudation of Zn as Ca-containing grains through the trichomes. *Plant and Cell Physiology*, 47, S155-S155.
- Harada E, Choi Y-E. 2008. Investigation of metal exudates from tobacco glandular trichomes under heavy metal stresses using a variable pressure scanning electron microscopy system. *Plant Biotechnology*, 25, 407-411.
- Harris A, Naidoo K, Nokes J, Walker T, Orton F. 2009. Indicative assessment of the feasibility of Ni and Au phytomining in Australia. *J Clean Prod* 17(2):194–200
- Haydon M, Cobbett C. 2007. Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytol.*, 174, 499-506.
- Hideki, A., Masaru, A. and Iwai, S.I. 1976. Synthesis and crystal structure of cadmium hydrogen phosphate hydrate. *Tokyo Ika Shika Daigaku Iyo Kizai Kenkyusho Hokoku*, 10, 63\_68.
- Hinsinger P. 1998. How do plant roots acquire mineral nutriments? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Adv. Agron.* 64, 225-265.

- Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 237, 173–195.
- Hinsinger P, Barros O, Benedetti M, Noack-Y, Callot-G. 2001. Plant-induced weathering of a basaltic rock: Experimental evidence. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65, 137-152.
- Hinsinger P, Plassard C, Tang C, Jaillard B. 2003. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248, 43–59.
- Hinsinger, P., Courchesne, F., 2008. Biogeochemistry of metals and metalloids at the soil–root interface. In: Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G.M. (Eds.), *Biophysico-Chemical Processes of Heavy Metals and Metalloids in Soil Environments*. JohnWiley & Sons, Inc., pp. 267–310.
- Hokura A, Onuma R, Kitajima N, Terada Y, Saito H, Abe T, Yoshida S, Nakai I. 2006. 2-D X-ray fluorescence imaging of cadmium hyperaccumulating plants by using high-energy synchrotron radiation X-ray microbeam. *Chemistry Letters*, 35, 1246-1247.
- Hoss S., Henschel T., Haitzer M., Traunspurger W., et Steinberg C. E. W. (2001) Toxicity of cadmium to *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) in whole sediment and pore water - The ambiguous role of organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(12), 2794-2801.
- Howden R, Cobbett CS. 1992. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 99: 100–107
- Howden R, Goldsborough PB, Andersen CR, Cobbett CS. 1995. Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. *Plant Physiol.*, 107, 1059-1066.
- Huerta-Diaz M. A. et Morse J. W. 1992. Pyritization of trace metals in anoxic marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 56, 2681-2702.
- Huguet S, Isaure MP, Barthès V, Szenknect S, Saumitou-Laprade P, Bert V, Laboudigue A, Sarret G. 2006. Accumulation of cadmium and zinc in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis lyrata* studied by autoradiography Paper presented at the Tracer 4, Autrans (France).
- Huynh T., Tong A. R., Singh B., et Kennedy B. J. 2003. Cd-substituted goethites - A structural investigation by synchrotron X-ray diffraction. *Clays Clay Miner.* 51(4), 397-402.
- Isaure MP. 2001. *Spéciation et transfert du zinc dans un dépôt de sédiment de curage contaminé: évolution le long du profil pédologique*, Univ. J. Fourier.
- Isaure MP, Laboudigue A, Manceau A, Sarret G, Tiffreau C, Trocellier P. 2001. Characterization of zinc in slags originated from a contaminated sediment by coupling  $\mu$ -PIXE,  $\mu$ -RBS,  $\mu$ -EXAFS and powder EXAFS spectroscopy. *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B*, 181, 598-602.
- Isaure MP, Laboudigue A, Manceau A, Sarret G, Tiffreau C, Trocellier P, Lamble G, Hazemann JL, Chateigner D. 2002. Quantitative Zn speciation in a contaminated dredged sediment by  $\mu$ -PIXE,  $\mu$ -SXRF, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66, 1549-1567.
- Isaure MP, Manceau A, Laboudigue A, Tamura N, Marcus MA. 2003. Zn speciation in a soil contaminated by the deposition of a dredged sediment by synchrotron X-ray techniques. *Journal De Physique Iv*, 107 Part 1, 657-660.

- Isaure MP, Manceau A, Geoffroy N, Laboudigue A, Tamura N, Marcus MA. 2005. Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 1173-1198.
- Isaure MP, Fayard B, Sarret G, Pairis S, Bourguignon J. 2006. Localization and chemical forms of cadmium in *Arabidopsis thaliana*. *Spectrochimica Acta B*, 61, 1242–1252.
- Ivask A., Virta M. and Kahru A., 2002. Construction and use of specific luminescent recombinant bacterial sensors for the assessment of bioavailable fraction of cadmium, zinc, mercury and chromium in the soil, *Soil Biol Biochem* 34, pp. 1439–1447.
- Jones D. L., Darrah P. R., et Kochian L. V. 1996. Critical evaluation of organic-acid mediated iron dissolution in the rhizosphere and its potential role in root uptake. *Plant and Soil* 180, 57-66.
- Juillot F. 1998. Localisation et spéciation de l'arsenic, du plomb, et du zinc dans des sites et sols contaminés. Comparaison avec un sol développé sur une anomalie géochimique naturelle en plomb. ph.D. thesis, Université Paris 7, France.
- Kaasalainen M. and Yli-Halla M. 2003. Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environmental Pollution*, 126, 225-233.
- Kabata-Pendias A. and Pendias H. 1992. Trace Elements in Soils and Plants, (2nd Ed.). , CRC Press, Boca Raton, FL
- Kabata-Pendias A. 2004. Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. *Geoderma*, 122, 143-149.
- Kaplan DI, Hunter DB, Bertsch PM, Bajt S, Adriano DC. 1994. Application of synchrotron X-ray fluorescence spectroscopy and energy dispersive X-ray analysis to identify contaminant metals on groundwater colloids. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1186-1189.
- Karlsson T, Persson P, Skjellberg U. 2005. Extended X-ray absorption fine structure spectroscopy evidence for the complexation of cadmium by reduced sulfur groups in natural organic matter. *Environmental Science and Technology*, 39, 3048-3055.
- Karlsson T, Skjellberg U. 2007. Complexation of zinc in organic soils - EXAFS evidence for sulfur associations. *Environmental Science and Technology*, 41, 119-124.
- Keddy C., Greene J. C. and Bonnell M. A. 1995. Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 221-251.
- Kelderman P., Drossaert W. M. E., Zhang Min, Galione L. S., Okonkwo L. C. and Clarisse I. A. 2000. Pollution assessment of the canal sediments in the city of Delft (the Netherlands). *Water Research*, 34, 3, 936-944.
- Keller C, Hammer D, Kayser A, Richner W, Brodbeck M, Sennhauser M. 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant and Soil*, 249, 67-81.
- Kersten M. and Förstner U. 1986. Chemical fractionation of heavy metals in anoxic estuarine and coastal sediments. *Wat. Sci. Tech.* 18, 121-130.
- Khalid R. A., Gambrell R. P. and Patrick W. H. 1981. Chemical availability of cadmium in Mississippi river sediment. *The Journal of Environmental Quality*, 10, 4, 523-528.

- Khan, D.H., Duckett J.G., Frankland B. and Kirkham J.B. 1984. An X-ray microanalytical study of the distribution of cadmium in roots of *Zea mays* L. *J. Plant Physiol.* 115: 19-28.
- Kidd P., Barceló J., Bernal M.P., Navari-Izzo F., Poschenrieder C., Shilev S., Clemente R., Monterroso C. 2009. Trace element behaviour at the root-soil interface: Implications in phytoremediation *Environmental and Experimental Botany*, Volume 67, Issue 1, , Pages 243-259
- King RF, Royle A, Putwain PD, Dickinson NM. 2006. Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environmental Pollution*, 143, 318-326.
- Kirk G. J. D., Santos E. E., et Findenegg G. R. 1999. Phosphate solubilization by organic anion excretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant and Soil* 211, 11-18.
- Kirpichtchikova T, Manceau A, Lanson B, Marcus MA, Jacquet T. 2003. Speciation and mobility of Zn, Cu and Pb in a truck farming soil contaminated by sewage irrigation. *Journal De Physique Iv*, 107 Part 1, 695-698.
- Kirpichtchikova TA, Manceau A, Spadini L, Panfili F, Marcus M, Jacquet T. 2006. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 70, 2163-2190.
- Koopmans GF, Römkens PFAM, Fokkema MJ, Song J, Y.M. Luo, Japenga J, Zhao FJ. 2008. Feasibility of phytoextraction to remediate cadmium and zinc contaminated soils. *Environmental Pollution*, 156, 905-914.
- Krämer, U., Cotter-Howells J.D., J.M. Charnock, Baker A.J.M. and Smith J.A.C. 1996. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature* 379: 635-638.
- Kramer U. 2000. Cadmium for all meals - plants with an unusual appetite. *New Phytologist*, 145, 1-3.
- Kramer U, Chardonnens AN. 2001. The use of transgenic plants in the bioremediation of soils contaminated with trace elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 661-672.
- Kribi S. 2005. Décomposition des matières organiques et stabilisation des métaux lourds dans les sédiments de dragage. Thèse de l'Université de Lyon, 2005, 220 p.
- Krishnamurti G.S.R., Huang P.M. et Kozak L.M. 1999. Desorption kinetics of Cadmium from soils using M Ammonium Nitrate and M Ammonium Chloride. *Comm. Soil. Sci. Plant. Anal.*, 30: 2785-2800.
- Küpper H, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP. 2000. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Planta*, 212, 75-84.
- Küpper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kroneck PMH. 2004. Tissue- and age-dependent differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges ecotype) revealed by X-ray absorption spectroscopy. *Plant Physiology*, 134, 748.
- Küpper H, Zhao FJ, McGrath SP. 1999. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol.*, 119, 305-311.

- Lacherez S (2007) Tolérance et accumulation du cadmium chez des populations métallicoles et non métallicoles d'*Arabidopsis halleri*. Verneuil en Halatte, INERIS-Rapport Master 1, pp 30
- Lamy I., Ducaroir J., Sterckeman T. and Douay F. 2002. *Réactivité des matières organiques*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 269-282. (Un point sur...).
- Lamy, C., Rothbacher, U., Caillol, D. and Lemaire, P. 2006. Ci-FoxA-a is the earliest zygotic determinant of the ascidian anterior ectoderm and directly activates Ci-sFRP1/5. *Development* 133, 2835-44.
- Lanson, B., Marcus, M.A., Fakra, S., Panfili, F., Geoffroy, N., Manceau, A., 2008. Formation of Zn–Ca phyllo-manganate nanoparticles in grass roots. *Geochim. Cosmochim. Acta* 72, 2478–2490
- Laperche V, Traina SJ, Gaddam P, Logan TJ. 1996. Chemical and mineralogical characterization of Pb in a contaminated soil: Reactions with synthetic apatite. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 3321-3326.
- Larsson E., Asp H., Bornman J. 2002. Influence of prior Cd(2+) exposure on the uptake of Cd(2+) and other elements in the phytochelatin-deficient mutant, cad1-3, of *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 53, 447–453.
- Lasat MM, Baker AJM, Kochian LV. 1996. Physiological characterisation of root Zn<sup>2+</sup> absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and non accumulator species of *Thlaspi*. *Plant Physiol.*, 112, 1715-1722.
- Lasat MM, Baker AJM, Kochian LV. 1998. Altered Zn compartmentation in the root symplasm and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 118, 875-883.
- Lebourg A., Sterckeman T. and Proix N. 1996. Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en trace du sol. *Agronomie*, 16, 201-215.
- Lee P.-K., Baillif P. and Touray J.-C. 1997. Geochemical behaviour and relative mobility of metals (Mn, Cd, Zn and Pb) in recent sediments of a retention pond along the A-71 motorway in Sologne, France. *Environmental Geology*, 32, 2, 142-152.
- Lee CY, Wei YL, Tsai HN, Yang YW, Lee JF. 2003. Characterization of lead species in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> contaminated with lead(II). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 833.
- Legros J.-P., Martin S., Baize D., Rivière J.-M. and Leprêtre A. 2002. *Accumulation de cuivre et de zinc dans une parcelle de l'Observatoire de la qualité des sols (OQS)*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 169-182. (Un point sur...).
- Leopold I, Gunther D, Schmidt J, Neumann D. 1999. Phytochelatin and heavy metal tolerance. *Phytochemistry*, 50, 1323-1328.
- Lesven L. 2008. Devenir des Eléments Traces Métalliques au Sein du Sédiment, un Compartiment Clé de l'Environnement Aquatique. Thèse de doctorat, USTL, Lille, 2008, 179p.

- Lindsay W. L., Vlek P. L. G., et Chien S. H. 1989. Phosphate minerals. In *Minerals in soil environment* (eds. J. B. Dixon et S. B. Weed), pp. 1089-1130. Soil Sci. Soc. Am., Madison.
- Liu C, Frenkel AI, Vairavamurthy A, Huang PM. 2001. Sorption of cadmium on humic acid: Mechanistic and kinetic studies with atomic force microscopy and X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Canadian Journal of Soil Science*, 81 (3) Special Iss. SI, 337-348.
- Lloyd-Thomas D. 1995. *Hyperaccumulation of heavy metal by Thlaspi caerulescens* J&C Presl., University of Sheffield, UK.
- Lobinski R, Moulin C, Ortega R. 2006. Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie*, 88, 1591-1604.
- Lock K. and Janssen C. R. 2005. Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution*, 136, 275-281.
- Logan T.J., Lindsay B.J, Goins L.E., Ryan J.A. 1997. Field assessment of sludge metal bioavailability to crops : Sludge rate response. *J. Envir. Qual.* 26, 534-550.
- Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP. 2002. Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 128, 1359-1367.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP. 2000. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytologist*, 145, 11-20.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP. 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: Natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality*, 30, 1919-1926.
- Lors C, Tiffreau C, Laboudigue A. 2004. Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments. *Chemosphere*, 56, 619-630.
- Lozano-Rodriguez, E., Hernandez L.E., Bonay P. and Carpena-Ruiz R.O. 1997. Distribution of cadmium in shoot and root tissues of maize and pea plants: physiological disturbances. *J. Exp. Botany* 48: 123-128.
- Luo, Y.M. and Christie P. 1998. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. *J. Environ. Qual.* 27:335-342.
- Ma Q. Y., Traina S. J., Logan T. J., et Ryan J. A. 1994. Effects of aqueous Al, Cd, Cu, Fe(II), Ni, and Zn on Pb immobilization hydroxyapatite. *Environ. Sci. Technol.* 28, 1219-1227.
- Ma Q. Y., Traina S. J., Logan T. J., et Ryan J. A. 1994. Effects of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{CO}_3^{2-}$  on Pb immobilization hydroxyapatite. *Environ. Sci. Technol.* 28, 408-418.
- Ma JF, Ueno D, Zhao FJ, McGrath SP. 2005. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, 220, 731-736.
- Macnair, M.R., Baker, A.J.M. 1994. Metal-tolerant plants: an evolutionary perspective. In: Farago, M.E. (Ed.), *Plants and the chemical elements*. VCH, Weinheim, pp. 67-85

- Macnair MR, Bert V, Huitson SB, Saumitou-Laprade P, Petit D. 1999. Zinc tolerance and hyperaccumulation are genetically independent characters. *Proceedings of the Royal Society of London*, B 266, 2175-2179
- Macnair M. 2002. Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. *New Phytol.*, 155, 59-66.
- Maes A., Vanthuyne M., Cauwenberg P., and Engels B. 2003. Metal partitioning in a sulfidic canal sediment: metal solubility as a function of pH combined with EDTA extraction in anoxic conditions. *Sci. Total Environ.* 312, 181-193.
- Magdaliniuk S., Pisano C., Vermersch M., Imbert T. and Allard V. 2002. *Enlèvement des sédiments-guide méthodologique-Evaluation détaillée des risques liés à la gestion des sédiments de curage*. 2002, 148 p.
- Manceau A. et Charlet L. 1992. X-ray absorption spectroscopic study of sorption of Cr (III) at the oxide-water interface. I. Molecular mechanism of Cr (III) oxidation on Mn oxides. *J. of Colloid & Interface Sci.* 148(2), 425-441.
- Manceau A, Boisset MC, Sarret G, Hazemann JL, Mench M, Cambier P, Prost R. 1996. Direct determination of lead speciation in contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Environ Sci. Technol.*, 30, 1540-1552.
- Manceau A, Lanson B, Schlegel ML, Hargé JC, Musso M, Eybert-Bérard L, Hazemann JL, Chateigner D, Lambie GM. 2000. Quantitative Zn speciation in smelter-contaminated soils by EXAFS spectroscopy. *Am. J. Sci.*, 300, 289-343.
- Manceau A, Marcus MA, Tamura N. 2002. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In: *Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science* (eds P. Fenter, M. Rivers, N. Sturchio, S. Sutton), pp. 341-428. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, Mineralogical Society of America, Washington, DC.
- Manceau A, Tamura N, Celestre R, MacDowell A, Geoffroy N, Sposito G, Padmore H. 2003. Molecular-scale speciation of Zn and Ni in soil ferromanganese nodules from loess soils of the Mississippi Basin. *Environ. Sci. Technol.*, 37, 75-80.
- Manouchehri N., 2006. Contribution à l'étude de la disponibilité des éléments traces métalliques (Pb, Cu, Cd) des sols à l'aide du réactif EDTA. Thèse à l'Université Paris 7, Denis Diderot. 216p.
- Marques L, Cossegal M, Bodin S, Czernic P, Lebrun M. 2004. Heavy metal specificity of cellular tolerance in two hyperaccumulating plants, *Arabidopsis halleri* and *Thlaspi caerulescens*. *New Phytologist*, 164, 289-295.
- Marschner H. 1995. *Mineral nutrition of higher plants, second edition* Academic Press, London.
- Marseille F, Tiffreau C, Laboudigue A, Lecomte P. 2000. Impact of vegetation on the mobility and bioavailability of trace elements in a dredged sediment deposit: a greenhouse study. *Agronomie*, 20, 547-556.
- Martell EA. 1974. Radioactivity of tobacco trichomes and insoluble cigarette smoke particles. *Nature*, 249, 215-217.
- Martínez-Alcalá, I., Clemente, R., Bernal, M.P. 2009. Metal availability and chemical properties in the rhizosphere of *Lupinus albus* L. growing in a high-metal calcareous soil. *Water Air Soil Pollut.* 201, 283-293.

- McBride MB. 1994. *Environmental chemistry of soils*.
- Mc Bride M. B., Richards B. K. and Steenhuis T. 2004. Bioavailability and crop uptake of trace elements in soil columns amended with sewage sludge products. *Plant and Soil*, 262, 71-84.
- McBride MB, Barrett KA, Kim B, Hale B. 2006. Cadmium sorption in soils 25 years after amendment with sewage sludge. *Soil Science*, 171, 21-28.
- McBride MB, Barrett KA, Martinez CE. 2006. Zinc and cadmium distribution and leaching in a metalliferous peat. *Water Air and Soil Pollution*, 171, 67-80.
- McGrath, S.P. 1998. Phytoextraction for soil remediation. In: Plants that hyperaccumulate heavy metals. R.R. Brooks. Wallingford, CAB International: 261-287.
- McGrath SP, Lombi E, Gray CW, Caille N, Dunham SJ, Zhao FJ. 2006. Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environmental Pollution*, 141, 115-125.
- McGrellis S., Serafini J.-N., JeanJean J., Pastol J.-L. and Fedoroff M. 2001. "Influence of the sorption protocol on the uptake of cadmium ions in calcium hydroxyapatite". *Separation and Purification Technology*, 24: 129-138.
- McLaughlin MJ, Singh B. 1999. *Cadmium in Soils and Plants*. eds Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- McLaughlin M, Zarcinas BA, Stevens DP, Cook N. 2000. Soil testing for heavy metals. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 31, 1661-1700.
- Meers E, Lamsal S, Vervaeke P, Hopgood M, Lust N, Tack FMG. 2005. Availability of heavy metals for uptake by *Salix viminalis* on a moderately contaminated dredged sediment disposal site. *Environmental Pollution*, 137, 354-364.
- Meers E, Ruttens A, Hopgood MJ, Samson D, Tack FMG. 2005. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere*, 58, 1011-1022.
- Meerts P, Van Isacker N. 1997. Heavy metal tolerance and accumulation in metallicolous and non-metallicolous populations of *Thlaspi caerulescens* from continental Europe. *Plant Ecology*, 133, 221-231.
- Mench M. J., Morel J.-L. and Guckert A. 1985. Liaison du cadmium avec la fraction macromoléculaire soluble des exsudats racinaires de Maïs (*Zea mays* L.). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, 301, III, 379-382.
- Mench M, Morel JL, Guckert A, Guillet B. 1988. Metal binding with root exudates of low molecular weight. *Journal of Soil Science*, 39, 521-527.
- Mench M VJ, Didier V, Clijsters H. 1994. Evaluation of metal mobility, plant availability and immobilisation by chemical agents in a limed-silty soil. *Environmental pollution*, 86, 279-286.
- Mench M. J. 1998. Cadmium availability to plants in relation to major long-term changes in agronomy systems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 67, 175-187.
- Mench M, Schwitzguébel JP, Schroeder P, Bert V, Gawronski S, Gupta S. 2009. Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. *Environ Sci Pollut Res Int*. 16(7):876-900.



- Mendoza-Cózatl D., Butko F., Springer F., Torpey J., Komives E., Kehr J. and Schroeder J. 2008. Identification of high levels of phytochelatins, glutathione and cadmium in the phloem sap of *Brassica napus*. A role for thiol-peptides in the long distance transport of cadmium and the effect of cadmium on iron translocation. *Plant J.* 54, 249-259).
- Mercier F., Moulin V., Guittet M. J., Barré N., Gautier-Soyer M., Trocellier P. and Toulhoat P. 2002. Application of new surface analysis techniques (NMA and XPS) to humic substances. *Organic Geochemistry*, 33, 247-255.
- Mertens J., Luyssaert S., Verbeeren S., Vervaeke P. and Lust N. 2001. Cd and Zn concentration in small mammals and willow leaves on disposal facilities for dredged material. *Environmental Pollution*, 115, 17-22.
- Middelburg J. J. and Comans R. N. J. 1991. "Sorption of cadmium on hydroxyapatite". *Chemical Geology*, 90: 45-53.
- Milner MJ, Kochian LV. 2008. Investigating heavy metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. *Annals of Botany*, 102, 3-13.
- Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. 2002. Rapport final « Historique national des opérations de curage et perspectives », paru dans Etude sur l'EAU n° 89.
- Miquel G. 2001. Rapport sur les effets des métaux sur l'environnement et la santé, déposé à l'Assemblée Nationale et au Sénat le 6 avril 2001.
- Mirouze M, Sels J, Richard O, Czernic P, Loubet S, Jacquier A, Francois I, Cammue B, Lebrun M, Berthomieu P, Marques L. 2006. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *Plant J.*, 47, 329-342.
- Mitchell A. and Baldwin D. S. 1998. Effects of desiccation/oxidation on the potential for bacterially mediated release from sediments. *Limnology and Oceanography*, 43, 3, 481-487.
- Morel J. L., Mench M., et Guckert A. 1986. Measurement of  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  binding with mucilage exudates from maize (*Zea mays L.*) roots. *Biol. Fertil. Soils* 2, 29-34.
- Morel J. L. 1997. Bioavailability of trace elements to terrestrial plants- Chapter 6. In *Soil Ecotoxicology* (eds. J. Tarradellas, G. Bitton, et D. Rossel), pp. 141-176. Lewis Publishers, CRC Press.
- Morin G, Ostergren JD, Juillot F, Ildefonse P, Calas G, Brown GE. 1999. XAFS determination of the chemical form of lead in smelter-contaminated soils and mine tailings: Importance of adsorption processes. *American Mineralogist*, 84, 420-434.
- Morse JW, Luther GW. 1999. Chemical influences on trace metal-sulfide interactions in anoxic sediments. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 63, 3373-3378.
- Myneni SCB. 2002. Soft X-ray Spectroscopy and Spectromicroscopy Studies of Organic Molecules in the Environment. In: Reviews in Mineralogy and Geochemistry. Applications of Synchrotron Radiation in Low-Temperature Geochemistry and Environmental Science (eds P. Fenter, M. Rivers, N. Sturchio, S. Sutton). Miner. Soc. of Am.
- Neuhausler U., Feng H., and Jones K. W. 2003. Characterization of sulfur in New York New Jersey waterway sediment. *J. Phys.* IV 104, 439-442. Neumann G., Massonneau A., Martinoia E., and Römhild V. (1999) Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208, 373-382.

- Nirel P.M.V., Morel F.M.M. 1990. Technical note, Pitfalls of sequential extractions. *Water Res.*, 24 (8), 1055-1056.
- Nolan, A. L., E. Lombi, et al. 2003. "Metal bioaccumulation and toxicity in soils - Why bother with speciation?" *Australian Journal of Chemistry* 56 (2-3): 77-91.
- Nolan AL, Zhang H, McLaughlin MJ. 2005. Prediction of zinc, cadmium, lead, and copper availability to wheat in contaminated soils using chemical speciation, diffusive gradients in thin films, extraction, and isotopic dilution techniques. *Journal of Environmental Quality*, 34, 496-507.
- Nriagu JO. 1989. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature*, 338, 47-49.
- O'Day P, Carrol SA, Waychunas GA. 1998. Rock-Water interactions controlling zinc, cadmium, and lead concentrations in surface waters and sediments, US tri-state mining district. 1. Molecular identification using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 32, 943-955.
- O'Day P., Carroll S. A., Randall S., Martinelli R. E., Anderson S. L., Jelinski J., and Knezovich J. P. (2000) Metal speciation and bioavailability in contaminated estuary sediments, Alameda naval air station, California. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3665-3673.
- Orioli IM, Vieira AR, Castilla EE, Ming JE, Muenke M. 2002. Mutational analysis of the sonic hedgehog gene in 220 newborns with oral clefts in a South American (ECLAMC) population. *Am J Med Genet.* 2002;108:12-15.
- Ortega R. 2005. Imagerie des éléments chimiques. Analyse par faisceau d'ions et rayonnement synchrotron. *Spectra Analyse*, 246, 36-39.
- Ortega R., Fayard B., Salomé M., Devès G., Susini J. 2005. Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in vitro to soluble or particulate chromate compounds. *Chemical Research in Toxicology*, 18, 1512-1519.
- Osan J., Kurunczi S., Torok S., and Van Grieken R. 2002. X-Ray analysis of riverbank sediment of the Tisza (Hungary): identification of particles from a mine pollution event. *Spectrochim. Acta Part B Atomic Spec.* 57, 413-422.
- Ostergren JD, Brown GE, Parks GA, Tingle TN. 1999. Quantitative speciation of lead in selected tailings from Leadville, Co. *Environ. Sci. technol.*, 33, 1627-1636.
- Ouerdane L., Mari S., Czernic P., Lebrun M. and Lobinski R. 2006. Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS. *J. Analytical Atomic Spectrometry* 21, 676-683.
- Page V, Weisskopf L, Felle U. 2006. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist*, 171, 329-341.
- Panfili F. 2004. *Etude de l'évolution de la spéciation du zinc dans la phase solide d'un sédiment de curage contaminé, induit par phytostabilisation*, Université de Provence - Aix-Marseille I.

- Panfili F, Manceau A, Sarret G, Marcus M, Bert V, Laboudigue A, Libert M. 2005. *Changes in Zn speciation in the rhizosphere of graminaceous plants induced by phytostabilization of a dredged contaminated sediment*. Paper presented at the 8th International Conference on the Biogeochemistry of Trace Elements (ICOBTE), 3-7 April 2005, Adelaide, Australia.
- Panfili F, Manceau A, Sarret G, Spadini L, Kirpichtchikova T, Bert V, Laboudigue A, Marcus M, Ahamdach N, Libert M. 2005. The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy and principal components analysis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69, 2265-2284.
- Papadopoulos P. and Rowell D.L. 1988. The reactions of cadmium with calcium carbonate surfaces, *Journal of Soil Science* 39, pp. 23–35.
- Parker D R, Chaney R L and Norvell W A. 1995. Chemical equilibrium models: Applications to plant nutrition research. In *Chemical equilibrium and reaction models*, Special Publication no 42. Eds R H Loeppert, P Schwab and S Goldberg. pp. 163–200. *Soil Science Society of America*, Madison, WI, USA.
- Pauwels M, Frérot H, Bonnin I, Saumitou-Laprade P. 2006. A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 19, 1838-1850.
- Peijnenburg W. J. G. M. and Jager T. 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 63-77.
- Peltier E, Dahl AL, Gaillard JF. 2005. Metal speciation in anoxic sediments: When sulfides can be construed as oxides. *Environmental Science and Technology*, 39, 311-316.
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DLD, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV. 2000. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4956-4960.
- Peng X, Du J, Fan J, Wang J, Wu Y, Zhao J, Sun S, Xu T. 2007. A selective fluorescent sensor for imaging Cd<sup>2+</sup> in living cells. *Journal of the American Chemical Society*, 129, pp 1500-1501.
- Perronnet K, Schwartz C, Gerard E, Morel JL. 2000. Availability of cadmium and zinc accumulated in the leaves of *Thlaspi caerulescens* incorporated into soil. *Plant and Soil*, 227, 257-263.
- Perronnet, K., Schwartz C. and Morel J.L. 2003. Distribution of cadmium and zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown on multicontaminated soil. *Plant Soil* 249: 19-25.
- Pickering IJ, Prince RC, George GN, Rauser WE, Wickramasinghe WA, Watson AA, Dameron CT, Dance IG, Fairlie DP, Salt DE. 1999. X-ray absorption spectroscopy of cadmium phytochelatin and model systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1429, 351-364.
- Pilon-Smits E, Pilon M. 2002. Phytoremediation of metals using transgenic plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 21, 439-456.

- Piou S., Bataillard P., Laboudigue A., Férard J.F., Masfaraud J.F. 2009. Changes in the geochemistry and ecotoxicity of a Zn and Cd contaminated dredged sediment over time after land disposal. *Environmental Research*, Vol. 109, Issue 6, 712-720.
- Poléc-Pawlak K., Ruzik R., Abramski K., Ciurzynska M. and Gawronska H. 2005. Cadmium speciation in *Arabidopsis thaliana* as a strategy study metal accumulation system in plants. *Anal. Chim. Acta* 540, 61–70.
- Post J. E. 1999. Manganese oxide minerals: Crystal structures and economic and environmental significance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96, 3447-3454.
- Pulford ID, Watson C. 2003. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International*, 29, 529-540.
- Puschenreiter M, Schnepf A, Millan IM, Fitz WJ, Horak O, Klepp J, Schrefl T, Lombi E, Wenzel WW. 2005. Changes of Ni biogeochemistry in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Thlaspi goesingense*. *Plant and Soil*, 271, 205-218.
- Quartacci, M.F., Irtelli, B., Gonnelli, C., Gabbrielli, R., Navari-Izzo, F., 2009. Naturally assisted phytoextraction by *Brassica carinata*: role of root exudates. *Environ. Pollut.*, Doi:10.1016/j.env.pol.2009.04.035.
- Quevauviller P. 1998. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standarization. *Trend. Anal. Chem.*, 17(5): 289-298.
- Qureshi S., Richards B. K., Hay A. G., Tsai C. C., Mc Bride M. B., Baveye P., and Steenhuis T. S. 2003. Effect of microbial activity on trace element release from sewage sludge. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3361-3366.
- Raskin, I., Smith R.D. and Salt D.E. 1997. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Op. Biotech.* 8: 221-226.
- Raskin I, Ensley B. 2000. *Phytoremediation of Toxic Metals*. Wiley, New York.
- Rauser, W.E. 1990. Phytochelatins. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 61-86.
- Rauser WE, Meuwly P. 1995. Retention of cadmium in roots of maize seedlings. Role of complexation by phytochelatins and related thiol peptides. *Plant Physiol.* 109: 195-202.
- Rauser, W.E. 1999. Structure and function of metal chelators produced by plants. *Cell Biochem. Bioph.* 31: 19-48.
- Rea, P.A., Li Z.-S., Lu Y.-P., Drozdowicz Y.M. and Martinoia E. 1998. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 727-760.
- Reeder RJ. 1996. Interaction of divalent cobalt, zinc, cadmium, and barium with the calcite surface during layer growth. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60, 1543–1552.
- Reeder RJ, Lamble GM, Northrup PA. 1999. XAFS study of the coordination and local relaxation around  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  trace elements in calcite. *Am. Mineral.*, 84, 1049-1060.
- Reeves RD, Baker AJM. 2000. Metal-accumulating plants. In: Raskin I, Ensley BD, eds. *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. New York, NY, USA: John Wiley, 193–229.

- Ressler T, Wong J, Roos J, Smith IL. 2000. Quantitative speciation of Mn-bearing particulates emitted from autos burning (methylocyclopentadienyl)manganese tricarbonyl-added gasolines using XANES spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 950-958.
- Ritchie et al., 2001 in Acute exposure guideline levels for selected airborne chemicals, Vol. 2, eds: National Research Council of National Academies USA (2002). ISBN-0-309-08511-X
- Roberts D, Scheinost A, Sparks D. 2002. Zinc speciation in a smelter-contaminated soil profile using bulk and microspectroscopic techniques. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1742-1750.
- Robinson NJ, Tommey AM, Jackson PJ. 1993. Plant metallothioneins. *Biochem. J.*, 295, 1-10.
- Robinson BH, Leblanc M, Petit D, Brooks RR, Kirkman JH, Gregg PEH. 1998. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soils. *Plant and Soil*, 203, 47-56.
- Roche A. L. 2001. Influence du séchage et de l'humidification sur le comportement des sédiments déposés sur le sol, 61 p.
- Romero S. 1999. La gestion des sédiments de dragage des cours d'eau. *Environnement et techniques*, 188, 31-35.
- Roosens N, Willems G, Saumitou Laprade P. 2008. Using *Arabidopsis* to explore zinc tolerance and hyperaccumulation. *Trends in Plant Science*, 13, 208-215.
- Sajidu S.M.I., Masamba W.R.L., Thole B. and Mwatseteza J.F. 2008. Groundwater fluoride levels in villages of Southern Malawi and removal studies using bauxite, *International Journal of Physical Sciences* 3 (1), pp. 001–011.
- Salt DE, Blaylock M, Kumar P, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I. 1995. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology*, 13, 468-474.
- Salt DE, Prince RC, Pickering IJ. 1995. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.*, 109, 1427-1433.
- Salt DE, Pickering IJ, Prince RC, Gleba D, Dushenkov S, Smith RD, Raskin I. 1997. Metal accumulation by aquacultured seedlings of indian mustard. *Environ. Science Technol.*, 31, 1636-1644.
- Salt DE, Prince RC, Baker AM, Raskin I, Pickering IJ. 1999. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 713-717.
- Salt DE, Kramer U. 2000. Mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *Phytoremediation of Toxic Metals*, 231-246.
- Sandström M, Jalilehvand F, Damian E, Fors Y, Gelius U, Jones M, Salomé M. 2005. Sulfur accumulation in the timbers of King Henry VIII's warship Mary Rose: A pathway in the sulfur cycle of conservation concern. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 14165–14170.
- Sappin-Didier V. 1995. Utilisation de composés inorganiques pour diminuer les flux de métaux dans deux agrosystèmes pollués : étude des mécanismes impliqués par l'emploi d'un composé du fer. Ph.D. thesis, University of Bordeaux I, France.

- Sappin-Didier V., Brayette S., Jadé C., Baize D., Masson P. and Mench M. J. 2002. *Phytodisponibilité du cadmium pour le blé. Rôle des paramètres pédologique et agronomiques*. In: D. Baize and M. Tercé. Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales. Paris: INRA, 2002, pp. 481-504. (Un point sur...)
- Sarret G, Connan J, Kasrai M, Eybert-Bérard L, Bancroft GM. 1999. Characterization of sulfur in asphaltenes by sulfur K- and L-edge XANES spectroscopy. *Journal of Synchrotron Radiation*, 6, 670-672.
- Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V, Proux O, Hazemann JL, Traverse A, Marcus MA, Manceau A. 2002. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 130, 1815-1826.
- Sarret G, Schröder W, Marcus M, Geoffroy N, Manceau A. 2003. Localization and speciation of Zn in mycorrhized roots by  $\mu$ SXRF and  $\mu$ EXAFS. *J. Phys. IV France*, 107, 1193-1195.
- Sarret G, Balesdent J, Bouziri L, Garnier JM, Marcus MA, Geoffroy N, Panfili F, Manceau A. 2004. Zn speciation in the organic horizon of a contaminated soil by micro X-ray fluorescence, micro and powder EXAFS spectroscopy and isotopic dilution. *Environ. Sci. Technol.*, 38, 2792-2801.
- Sarret G, Harada E, Choi YE, Isaure MP, Geoffroy N, Birschwilks M, Clemens S, Fakra S, Marcus MA, Manceau A. 2006. Trichomes of tobacco excrete zinc as Zn-substituted calcium carbonate and other Zn-containing compounds. *Plant Physiology*, 141, 1021-1034.
- Sarret G., Willems G., Isaure MP., Marcus M.A., Fakra S., Frérot H., Pairis S., Geoffroy N., Manceau A., and Saumitou-Laprade P. 2009. Zn distribution and speciation in *Arabidopsis halleri* x *Arabidopsis lyrata* progenies presenting various Zn accumulation capacities, *New Phytologist*, doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02996.x.
- Sauvé S, Hendershot W, Allen H. 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: Dependence on pH, total metal burden, and organic matter. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1125-1131.
- Scally S., Davison W., Zhang H. 2006. Diffusion coefficients of metals and metal complexes in hydrogels used in diffusive gradients in thin films. *Analytica Chimica Acta* 558 (2006) 222-229
- Schat H, Vooijs R, Kuiper E. 1996. Identical major gene loci for heavy metal tolerances that have independently evolved in different local populations and subspecies of *Silene vulgaris*. *Evolution*, 50, 1888-1895.
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley Whitaker J, Bleeker PM. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Botany*, 53, 2381-2392.
- Schlegel ML, Manceau A. 2006. Evidence for the nucleation and epitaxial growth of Zn phyllosilicate on montmorillonite. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 70, 901-917.
- Schneider G. 2001. Boues de curage des cours d'eau. Le courrier de l'environnement de l'INRA, 43, 146-147.

- Schröder P, Herzig R, Bojnov B, Ruttens A, Nehnevajova E, Stamatiadis S, Memon A, Vassilev A, Caviezel M, Vangronsveld J. 2008. Bioenergy to save the world. Producing novel energy plants for growth on abandoned land. *Environ Sci Pollut Res* 15:196–204
- Schwartz C, Morel JL, Saumier S, Whiting SN, Baker AJM. 1999. Root development of the Zinc-hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by metal origin, content and localization in soil. *Plant and Soil*, 208, 103-115
- Schwartz C, Guimont S, Saison C, Perronnet K, Morel JL. 2001. Phytoextraction of Cd and Zn by the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens* as affected by plant size and origin. *South African Journal of Science*, 97 (11-12) Part 2, 561-564.
- Schwartz C, Echevarria G, Morel JL. 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant and Soil*, 249, 27-35.
- Schwertmann U. et Taylor R. M. 1989. Iron oxides. In *Minerals in the soil environment* (eds. J. B. Dixon et S. B. Weed), pp. 379. SSSA Book Ser. n°1, Madison.
- Schwitzguébel J. P., Van der Lelie D., Baker A., Glass D. J., Vangronsveld J. 2002. Phytoremediation: European and American trends. *Journal Soil & Sediments*, 2, 91-99.
- Sery A., Manceau A., et Greaves N. G. 1996. Chemical state of Cd in apatite phosphate ores as determined by EXAFS spectroscopy. *Am. Mineralogist* 81, 864-873.
- Shen ZG, Zhao FJ, McGrath SP. 1997. Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. *Plant cell environ*, 20, 898-906.
- Shen RF, Ma JF. 2001. Distribution and mobility of aluminium in an Al-accumulating plant, *Fagopyrum esculentum Moench*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1683-1687.
- Sigg L., Bin X.H., Kistler D., Schönenberger R. 2000. Size fractionation (dissolved, colloidal and particulate) of trace metals in the Thur River, Switzerland. *Aquat. Geochem.*, 6, 4, 413-434
- Simpson SL, Apte SC, Batley GE. 1998. Effect of short term resuspension events on trace metal speciation in polluted anoxic sediments. *Environmental Science and Technology*, 32, 620-625.
- Sinclair SA, Sherson SM, Jarvis R, Camakaris J, Cobbett CS. 2007. The use of the zinc-fluorophore, Zinpyr-1, in the study of zinc homeostasis in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist*, 174, 39-45.
- Smolders E, Brans K, Foldi A, Merckx R. 1999. Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63, 78-85.
- Sneller FEC, van Heerwaarden LM, Koevoets PLM, Vooijs R, Schat H, Verkleij JAC. 2000. Derivatization of phytochelatins from *Silene vulgaris*, induced upon exposure to arsenate and cadmium: comparison of derivatization with Ellman's reagent and monobromobimane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 4014–4019.
- Sobanska S, Ricq N, Laboudigue A, Guillermo R, Brémard C, Laureyns J, Merlin JC, Wignacourt JP. 1999. Microchemical investigations of dust emitted by a lead smelter. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 1334-1339.
- Sondergaard M., Jensen J. P., et Jeppesen E. 2001. Retention and internal loading of phosphorus in shallow, eutrophic lakes. *The Scientific World* 1, 427-442.

- Song J, Zhao FJ, Luo YM, McGrath SP, Zhang H. 2004. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, 128, 307-315.
- Sors TG, Ellis DR, Na GN, Lahner B, Lee S, Leustek T, Pickering IJ, Salt DE. 2005. Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *Plant Journal* 42: 785–797.
- Spadini L, Manceau A, Schindler PW, Charlet L. 1994. Structure and Stability of  $\text{Cd}^{2+}$  Surface Complexes on Ferric Oxides. I. Results from EXAFS Spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 168, 73-86.
- Sposito G. 1984. the surface chemistry of soils, Oxford university Press.
- Sposito G (1989). The chemistry of soils. Oxford Univ. Press, New York.
- Straczek A. 2003. Mobilisation, accumulation et distribution de Zn par et dans des tabacs modifiés pour leur capacité d'excrétion de protons et d'accumulation des métaux, Thèse de l'Ecole National Supérieure Agronomique de Montpellier.
- Stephan, U.W., Schmidke I., Stephan V.W. and Scholz G. 1996. The nicotianamine molecule is made-to-measure for complexation of metal micronutrients in plants. *BioMetals* 9: 84-90.
- Stephens SR, Alloway BJ, Parker A, Carter JE, Hodson ME. 2001. Changes in the leachability of metals from dredged canal sediments during drying and oxidation *Environmental Pollution*, 114, 407-413.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H. 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ. Pollut.*, 107, 377-389.
- Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H, Perdrix E. 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air and Soil Poll.*, 135, 173-194.
- Sterckeman T., Perriguet J., Caël M., Schwartz C. and Morel J.-L. 2004. Applying a mechanistic model to cadmium uptake by *Zea mays* and *Thlaspi caerulescens*: consequences for the assessment on the soil quantity and capacity factors. *Plant and Soil*, 262, 289-302.
- Stumm W. and Morgan J. J. 1996. In *Aquatic Chemistry: Chemical Equilibria and Rates in Natural Waters* (3rd ed.), Wiley, New York, 1022 p.
- Strawn DG, Baker LL. 2008. Speciation of Cu in a contaminated agricultural soil measured by XAFS,  $\mu$ -XAFS, and  $\mu$ -XRF. *Environ Sci Technol* 42:37–42 doi:10.1021/es071605z
- Susarla, S., Medina V.F. and McCutcheon S.C. 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Eng.* 18: 647-658.
- Sun RL, Zhou QX, Jin CX. 2006. Cadmium accumulation in relation to organic acids in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Plant & Soil*, 285, 125-134.
- Sun Q, Ye ZH, Wang XR, Wong MH. 2007. Cadmium hyperaccumulation leads to an increase of glutathione rather than phytochelatins in the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1489–98.



- Szymanski J T. 1978. The crystal structure of cernýite,  $\text{Cu}_2\text{CdSnS}_4$ , a cadmium analogue of stannite, *The Canadian Mineralogist*, 16, 147-151
- Tack F. M., Callemaert O. W. and Verloo M. G. 1996. Metal solubility as a function of pH in a contaminated dredged sediment affected by oxidation. *Environmental Pollution*, 91, 2, 199-208.
- Tack F. M., Singh S. P. and Verloo M. G. 1998. Heavy metal concentrations in consecutive saturation extracts of dredged sediment derived surface soils. *Environmental Pollution*, 103, 109-115.
- Tack FMG, Singh SP, Verloo MG. 1999. Leaching behaviour of Cd, Cu, Pb and Zn in surface soils derived from dredged sediments. *Environmetanl Pollution*, 106, 107-114.
- Takamatsu R, Asakura K, Chun WJ, Miyazaki T, Nakano M. 2006. EXAFS studies about the sorption of cadmium ions on montmorillonite. *Chemistry Letters*, 35, 224-225.
- Talke IN, Hanikenne M, Kramer U. 2006. Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiology*, 142, 148-167.
- Tandy, S., Schulin, R., Nowack, B., 2006. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers. *Chemosphere* 62, 1454–1463.
- Tauriainen S., Karp M., Chang W. and Virta M. 1998. Luminescent bacterial sensor for cadmium and lead, *Biosens Bioelectron* 13, pp. 931–938.
- Taylor M.D. and Theng B.K.G. 1995. Sorption of cadmium by complexes of kaolinite with humic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis* 26 5–6, pp. 765–776.
- Terzano R, Spagnuolo M, Vekemans B, De Nolf W, Janssens K, Falkenberg G, Flore S, Ruggiero P. 2007. Assessing the origin and fate of Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, and V in industrial polluted soil by combined microspectroscopic techniques and bulk extraction methods. *Environ Sci Technol* 41:6762–6769 doi:10.1021/es070260h
- Tessier D. 1994. Rôle de l'eau sur les propriétés physiques des sols. *Sécheresse*, 5, 3, 143-150.
- Thiry M, Huet Taillanter S, Schmitt JM. 2002. The industrial waste land of Mortagne-du-Nord (59) - I - Assesment, composition of the slags, hydrochemistry, hydrology and estimate of the outfluxes. *Bulletin De La Societe Geologique De France*, 173 (4), 369-381.
- Thiry M, van Oort F. 1999. De l'échantillonnage à la spéciation: pettinnence des analyses minéralogiques par diffraction des rayons X dans les sites et sols pollués par des métaux. In: *Spéciation des métaux dans les sols*, pp. 96-107. Les Cahiers des Clubs CRIN.
- Tiffreau C., Isaure M.P., Laboudigue A., Lors C., Marseille F. 1999. Problématique des sédiments toxiques : impact sur sol non pollué du dépôt de sédiments contaminés, Rapport CNRSSP n°35.
- Treeby, M., Marschner, H., Römheld, V., 1989. Mobilization of iron and other micronutrient cations from calcareous soil by plant-borne, microbial and synthetic metal chelators. *Plant soil* 114, 217–226.
- Trivedi P, Axe L. 2001. Predicting divalent metal sorption to hydrous Al, Fe, and Mn oxides. *Environmental Science & Technology*, 35, 1779.

- Trolard F, Bourrié G, Jaffrezic A. 2002. Distribution spatiale et mobilité des ETM en région d'élevage intensif. In: D. Baize and M. Tercé. *Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales.*, pp. 183-199. INRA, Paris.
- Ueno D, Iwashita T, Zhao F, Ma J. 2008. Characterization of Cd translocation and identification of the Cd form in xylem sap of the Cd-hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant and Cell Physiology*, 49, 540-548.
- Ueno D, Ma JF, Iwashita T, Zhao FJ, McGrath SP. 2005. Identification of the form of Cd in the leaves of a superior Cd-accumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* using Cd-113-NMR. *Planta*, 221, 928-936.
- Uhlig, C., Salemaa M., Vanha-Majamaa I. and Derome J. 2001. Element distribution in *Empetrum nigrum* microsites at heavy metal contaminated sites in Harjavalta, western Finland. *Environ. Poll.* 112: 435-442.
- Ullrich S. M., Ramsey M. H. and Helios-Rybicka E. 1999. Total and exchangeable concentrations of heavy metals in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in Upper Silesia, Poland. *Applied Geochemistry*, 14, 187-196.
- Van Cappellen P. et Berner R. A. 1991. Fluoroapatite crystal growth from modified seawater solutions. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55, 1219-1234.
- Van Der Lelie N, Schwitzguebel JP, Glass DJ, Vangronsveld J, Baker A. 2001. Assessing phytoremediation's progress in the United States and Europe. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 446 A-452 A.
- Vangronsveld J, Sterckx J, Van Assche F, Clijsters H. 1995. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping ground: effects of revegetation and metal immobilization by beringite. *J. geochemical exploration*, 52, 221-229.
- Vangronsveld J, Van Assche F, Clijsters H. 1995. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environmental Pollution*, 87, 51-59.
- Vangronsveld J. 1998. Case studies in the field-industrial sites: phytostabilization of zinc-smelter contaminated sites: the Lommel-Maatheid case. In *Metal-contaminated soils : in situ inactivation and phytoremediation* (eds. J. Vangronsveld and S. D. Cunningham), pp. 211-216. Springer Verlag, Berlin.
- Vangronsveld J., Diels L., van der Lelie D., Bierkens J., Corbisier P., Spelmans N., Adriaenssens E., Carleer R., Van Poucke L., Ruttens A., Colpaert J. and Clijster H. 2002. *Réhabilitation par immobilisation des métaux. Sites de Lommel-Maatheide (Belgique)*. In: D. Baize and M. Tercé. *Les éléments traces métalliques dans les sols, approches fonctionnelles et spatiales*. Paris: INRA, 2002, pp. 393-408. (Un point sur...).
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., Van der Lelie, D., Mench, M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Poll. Res.*, Environ Sci Pollut Res DOI 10.1007/s11356-009-0213-6.
- Vansimaey C., Alary C., Bataillard P., Zentar R., Laboudigue A., 2009. Ripening of contaminated sediments: effect on organic matter-bound and iron oxides-bound metals, ICOBTE 2009, Chihuahua, Mexico.

- Vassilev A, Schwitzguebel JP, Thewys T, Van-Der-Lelie D, Vangronsveld J. 2004. The use of plants for remediation of metal-contaminated soils. *Scientific World Journal*, 4, 9-34.
- Vatamaniuk, O.K., Bucher E.A., Ward J.T. and Rea P.A. 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. *J. Biol. Chem.* 276: 20817-20820.
- Vauléon C, Tiffreau C, Laboudigue A. 2001. *Migration des polluants métalliques: cas d'un dépôt de sédiments contaminés sur un sol non pollué*, (vol. 8). La Houille Blanche.
- Verbruggen N, Hermans C, Schat H. 2009. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytologist*, 181, 759-776.
- Vervaeke P, Luyssaert S, Mertens J, Meers E, Tack FMG, Lust N. 2003. Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. *Environmental Pollution*, 126 (2), 275-282.
- VNF (Voies Navigables de France) – Guide de Dragage 2008
- Vogel-Mikuš K, Regvar M, Mesjasz-Przybylowicz J, Przybylowicz WJ, Simcic J, Pelicon P, Budnar. 2005. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* using micro-PIXE. *New Phytologist* 179: 712–721.
- Vögeli-Lange, R. and Wagner G.J. 1990. Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides. *Plant Physiol.* 92: 1086-1093.
- Wagner, G.J. 1993. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agronomy* 51: 173-212.
- Walton B.T. and Edwards N.T. 1986. Accumulation of organic waste constituents in terrestrial biota, Land treatment : a hazardous waste management alternative - *Water resource Symposium, N\_13: RC Loehr and JF Malina. (Centre for Research in Water Ressources - Bureau of Engineering, Research College of Engineering, The University of Texas).*
- Wang, J. and V.P. Evangelou 1995. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. In: *Handbook of plant and crop physiology*. M. Pessarakli. New York, Marcel Dekker, Inc: 695-717.
- Wasserman SR. 1997. The analysis of mixtures: application of principal component analysis to XAS spectra. *J. Phys. IV*, 7, 203-205.
- Webb S, Leppard G, Gaillard J. 2000. Zinc speciation in a contaminated aquatic environment: Characterization of environmental particles by analytical electron microscopy. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1926-1933.
- Weber M, Harada E, Vess C, von Roepenack Lahaye E, Clemens S. 2004. Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *Plant Journal*, 37, 269-281.
- Weber M, Trampczynska A, Clemens S. 2006. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd<sup>2+</sup>-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell and Environment*, 29, 950-963.
- Wenzel WW, Bunkowski M, Puschenreiter M, Horak O. 2003. Rhizosphere characteristics of indigenously growing nickel hyperaccumulator and excluder plants on serpentine soil. *Environmental Pollution*, 123 (1), 131-138.

- Wenzel WW, Jockwer F. 1999. Accumulation of heavy metals in plants grown on mineralised soils of the Austrian Alps. . *Environmental Pollution*, 104, pp. 145–155. .
- Whiting, S.N., Leake J.R., McGrath S.P. and Baker A.J.M. 2000. Positive responses to Zn and Cd by roots of the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 145: 199-210.
- Wieshammer G, Unterbrunner R, Bañares García T, Zivkovic MF, Puschenreiter M, Wenzel WW. 2007. Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* ssp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri* *Plant Soil*, 298, 255-264.
- Willems G, Dräger D, Courbot M, Godé C, Verbruggen N, Saumitou-Laprade P. 2007. The genetic basis of zinc tolerance in the metallophyte *Arabidopsis halleri* ssp. *halleri* (Brassicaceae): an analysis of quantitative trait loci. *Genetics*, 176, 659-674.
- Wojcik M, Vangronsveld J, J DH, Tukiendorf A. 2005. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* - I. Growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 53, 151-1611.
- Xia K, Bleam W, Helmke PA. 1997. Studies of the nature of binding sites of first row transition elements bound to aquatic and soil humic substances using X-ray absorption spectroscopy. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61, 2223-2235.
- Xiang, C., Werner B.L., Christensen E.M. and Oliver D.J. 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiol.* 126: 564-574.
- Xing JP, Jiang RF, Ueno D, Ma JF, Schat H, McGrath SP, Zhao FJ. 2008. Variation in root-to-shoot translocation of cadmium and zinc among different accessions of the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi praecox*. *New Phytologist*, 178 (2), 315-325.
- Yang XE, Long XX, Ye HB, He ZL, Calvert DV, Stoffella PJ. 2004. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). *Plant and Soil* 259: 181–189.
- Yang X.E., Li T.Q., Long X.X., Xiong X.H., He Z.H., Stoffella P.J. 2006. Dynamics of zinc uptake and accumulation in the hyperaccumulating and non-hyperaccumulating ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Plant and Soil* 284:109–119.
- Yun W, Pratt ST, Miller RM, Cai Z, Hunter DB, Jarstfer AG, Kemner KM, Lai B, Lee HR, Legnini DG, Rodrigues W, Smith CI. 1998. X-ray imaging and microspectroscopy of plants and fungi. *J. Synchr. Rad.*, 5, 1390-1395.
- Zachara J. M., Cowan C. E. and Resch C. T. 1991. Sorption of divalent metals on calcite. *Geoch. Cosmoch. Acta.* 55, 1549-1562.
- Zebracki M. 2008. *Devenir des polluants métalliques associés aux sédiments contaminés dans un cours d'eau en relation avec la dynamique sédimentaire*. Université Paris-Sud XI.
- Zeng Q.R., Sauvé S., Aleen H.E. et Hendershot W.H. 2004. Recycling EDTA solutions used to remediate metal-polluted soils. *Environ. Poll.*, 133(2): 225-231.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants- a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhang F., Romheld V., et Marschner H. 1989. Effet of zinc deficiency in wheat on the release of zinc and iron mobilizing root exudates. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152, 205-210.

- Zhang H., Davison W., Miller S. and Tych W. 1995. In situ resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe, and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT, *Geochim. Cosmochim. Ac.* 59, pp. 4181–4192.
- Zhang H, Zhao FJ, Sun B, Davison W, McGrath SP. 2001. A new method to measure effective soil solution concentration predicts copper availability to plants. *Environmental Science and Technology*, 35, 2602-2607.
- Zhang M. K., He Z. L., Stoffella P. J., Calvert D. V., Yang X. and Sime P. L. 2003. Concentrations and solubility of heavy metals in muck sediments from the St. Lucie Estuary, U.S.A. *Environmental Geology*, 44, 1-7.
- Zhang H, Lombi E, Smolders E, McGrath S. 2004. Kinetics of Zn release in soils and prediction of Zn concentration in plants using diffusive gradients in thin. *Environmental Science and Technology*, 38, 3608-3613.
- Zhao F, Lombi E, Breedon T, McGrath S. 2000. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. *Plant Cell Environment*, 23, 507-514.
- Zhao F, Jiang RF, Dunham SJ, McGrath SP. 2006. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *New Phytologist*, 172, 646-654.
- Zhu, Y.L., Pilon-Smits E.A.H., Tarun A.S., Weber S.U., Jouanin L. and Terry N. 1999. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase. *Plant Physiol.* 121: 1169-1177.
- Zhuang Y., Allen H. E., and Fu G. 1994. Effect of aeration of sediment on cadmium binding. *Environ. Tox. Chem.* 13, 717-724.
- Zhuang F. S., Ma J., and Cao Y. P. 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish and rape plants. *Plant and Soil* 196, 261-264



# **ANNEXES**





# Table des Annexes

Annexe II-1 : Principales caractéristiques de la terre agricole.....	301
Annexe II-2 : Listes des composés de référence .....	303
Annexe II-3 : Mesures des diamètres des rosettes de <i>A. halleri</i> .....	307
Annexe II-4 : Evolution d' <i>A. halleri</i> d'origine MET au cours de l'expérience de culture sur sédiment.....	309
Annexe II-5 : Concentrations en Ni, Pb et As dans les parties aériennes d' <i>A. halleri</i> ..	311
Annexe II-6 : Evolution des paramètres physico-chimiques du sédiment au cours de la culture <i>A. halleri</i> : pH et teneur en carbone totale.....	311
Annexe II-7 : Spectre DRX du composé de référence d'un sulfure mixte (Zn,Cd,Fe)S	313
Annexe 8 : Détermination du nombre de composantes utilisées pour les simulations par combinaisons linéaires en fonction du critère d'efficacité.....	315
Annexe II-9 : Analyses MEB-EDS d'une racine d' <i>A. halleri</i> isolée du sédiment .....	319
Annexe III-1 : supply information SI-1 de l'article « autoradiographie ».....	321
Annexe III-2 : supply information SI-2 de l'article « autoradiographie ».....	323
Annexe III-3 : supply information SI-3 de l'article « autoradiographie ».....	325
Annexe III-4 : supply information SI-4 de l'article « autoradiographie ».....	327
Annexe III-5 : protocole de dosage des phytochelatines et du glutathion.....	329
Annexe III-6 : Meilleures simulations par CL .....	333



## Annexe II-1 : Principales caractéristiques de la terre agricole

Caractérisation de sol			Terre Agricole	
Argiles	< 2 $\mu\text{m}$	%	24	(1)
Limons	2 $\mu\text{m}$ - 50 $\mu\text{m}$	%	78	(1)
Sables	50 $\mu\text{m}$ - 2 mm	%	17	(1)
CaCO <sub>3</sub> (total)			6.3	(1)
TC			1.91 $\pm$ 0.05	(5)
pH, H <sub>2</sub> O			8.47 $\pm$ 0.05	(3)
MO			33	(1)
CEC Metson			13.3	(1)
K (K <sub>2</sub> O) échangeable			242	(1)
Mg (MgO) échangeable			118	(1)
Ca (CaO) échangeable			11610	(1)
Na (Na <sub>2</sub> O) échangeable			25	(1)
P (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) Olsen			94	(1)
Cd concentration			0.40 $\pm$ 0.01	(3)
Zn concentration			75.6 $\pm$ 0.1	(3)
Cu concentration			17.16 $\pm$ 0.02	(3)
Pb concentration			20.8 $\pm$ 0.1	(3)
Ni concentration			27.1 $\pm$ 0.2	(3)
As concentration			8.3 $\pm$ 0.1	(3)



## Annexe II-2 : Listes des composés de référence

##### FICHIERS Cd #####

### #MINERAUX

#CdCl<sub>2</sub> ambiante  
Ref=CdCl<sub>2</sub>.ki3  
#CdCO<sub>3</sub> 10K  
Ref=CdCO<sub>3</sub>.ki3  
#Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ambiante  
Ref=Cd-NO<sub>3</sub>.ki3  
#CdO 10K  
Ref=CdO.ki3  
#Cd(OH)<sub>2</sub> ambiante  
Ref=CdOH<sub>2</sub>.ki3  
#Cd Phosphate: Cd<sub>5</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, synthèse Marie-Pierre Isaure vérifié par XRD  
10K  
Ref=Cdphos.ki3  
#Cd-phosphate poudre (Alfa) DRX: Cd<sub>5</sub>H<sub>2</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>4</sub>, 4H<sub>2</sub>O et Cd<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH),  
synthèse Marie-Pierre Isaure, ambiante  
Ref=Cdphosa.ki3,  
#CdS 10K  
Ref=CdS-061.ki3  
#CdSO<sub>4</sub> 10K  
Ref=CdSO<sub>4</sub>.ki3  
#sulfure mixte (Zn,Cd,Fe)S 10K  
Ref=luchon.ki3

### #ESPECES ADSORBÉES

#Cd aerosol synthèse Marie-Pierre Isaure  
Ref=Cdaero.ki3

### #COMPLEXES ORGANIQUES SOLIDES

#Cd acetate dihydrate, synthèse Barbara Gouget, 10K  
Ref=Cdacet.ki3  
#Cd alginate 5000 ppm humide 16 K  
Ref=Cdalg5h.ki3  
#Cd-cellulose 5000 ppm Cd lyophilisé re- humidifié, synthèse Marie-Pierre Isaure  
16 K  
Ref=Cdcell5h.ki3  
#Cd-cellulose 5000 ppm Cd lyophilisé sec, synthèse Marie-Pierre Isaure 16 K  
Ref=Cdcell5.ki3  
#metallothionein de moule SPIN, synthèse Marie-Pierre Isaure 10 K  
Ref=CdMT.ki3  
#Cd Oxalate anhydre, synthèse Marie-Pierre Isaure 10 K  
Ref=Cdoxanhy.ki3

#Cd paroi racine tabac 200 ppm, synthèse Marie-Pierre Isaure 10 K  
 Ref=Cdpar2.ki3  
 #Cd paroi racine tabac 10000, synthèse Marie-Pierre Isaure 10 K  
 Ref=Cdpar1.ki3  
 #Cd- Pectine 5000 rehumidifie eau+glycerol, synthèse Marie-Pierre Isaure 16 K  
 Ref=Cdpec5h.ki3  
 #Cd Pectine 1000 ppm humide, synthèse Marie-Pierre Isaure 16 K  
 Ref=Cdpec1h.ki3

## #SOLUTIONS

#10 mM Cd<sup>2+</sup> pH 2.2 10K, synthèse Marie-Pierre Isaure  
 Ref=Cd2plus.ki3  
 #Cd citrate solution 5 mM Cd 50 mM Citrate pH 5.5, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=Cdcits.ki3  
 #5 mM Cd 50 mM Cysteine pH 3.15, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=cdcyss.ki3  
 #5 mM Cd 50 mM Glutathion pH 2.9, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=CdGTT29.ki3  
 #2.5 mM Cd 25 mM Histidine pH 5.5, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=Cdhiss.ki3  
 #5 mM Cd 50 mM Malate pH 5.5, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=Cdmal55.ki3  
 #Cd melange: Cd 5 mM citrat 14 malat 100 succin 400 mM pH 5.5, synthèse Marie-Pierre Isaure 16K  
 Ref=Cdmel.ki3  
 #2.4 mM Cd 12 mM Nicotianamine pH entre 5 et 6, synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=Cdnico.ki3  
 #Cd-phytochel (PC2) L/M =5, 108ppm Cd, préparé en sac à gant sous N<sub>2</sub>, synthèse Marie-Pierre Isaure 16K  
 Ref=CdPC2-5.ki3  
 #Cd-phytochelatine (PC2), L/M =10, 87 ppm Cd, préparé en sac à gant sous N<sub>2</sub>, synthèse Marie-Pierre Isaure 16K  
 Ref=CdPC2-10.ki3  
 #5 mM Cd 50 mM Succinate pH 5.5 , synthèse Marie-Pierre Isaure 10K  
 Ref=Cdsuc.ki3

## #associé à des (OXY-)HYDROXYDE DE FER (ref Spadini et al., 1993 ; K range entre 4 et 15)

#Cd associé à la goethite avec Cd à 100% du taux de recouvrement  
 Ref=Cd-Gt100.ki3  
 #Cd sur HFO (hydrous ferric oxyde) à 90% du taux de recouvrement  
 Ref=CdHFO90.ki3  
 #Cd coprécipité avec de la goethite  
 Ref=CdGtcopr.ki3

# ##### FICHIERS S #####

Tous les composés de références du S ont été préparés par G. Sarret à l'exception de CdS et (Zn,Cd,Fe)S

Compound	Nom fichier
<b>MINERAL SULFIDE</b>	
FeS: iron sulfide or troilite (deg d'ox. -2)	fes
pyrite FeS <sub>2</sub> (deg d'oxyd -1)	pyrite
<b>CdS</b>	<b>CdS</b>
<b>(Zn,Cd,Fe)S</b>	<b>luchon</b>
<b>DISULFIDE</b>	
DL cystine (C-S-S-C)	cysti
Dibenzyl disulfide	bdsfd
<b>MONOSULFIDE</b>	
S-benzyl-L-cysteine (cycle-C-S-C)	ben-cys
DL-methionine (C-S-C)	methio
S-methyl-L-cysteine (C-S-C)	s-cys
DL-cysteine	dl-cys
Thiosalicylic acid (a. sali avec SH au lieu de OH)	thiosa
<b>THIOPHENE</b>	
1, 2-benzodiphenylene sulfide (benzo naphtho thiophene)	bdps
2-(4-Methoxy benzoyl) thiophene, Aldrich (thioph-C=O-benzene-O-CH <sub>3</sub> )	mbthio
Thianthrene (DBT a 6 avec 2 S face a face)	thia
3-(2-thienyl)-DL-acrylic acid (thiophene avec chaine aliph en α)	thiacr
3-(2-thienyl)-DL-alanine (thiophene avec chaine aliph en α)	alani
2,5-Thiophene dicarboxylic acid, Aldrich	thcar
3-Thiophene malonic acid, Aldrich	thmal
Thioxanthene-9-one (DBT a 6 avec C=O en haut)	thioxt
Tilorone analog (DBT avec C=O sur chaines des deux cotes)	tilor
<b>SULFOXIDE</b>	
Benzyl sulfoxide, Aldrich	bensfx
Diphenyl sulfoxide	dpsfx
DL-Methionine sulfoxide (C-S <sup>=O</sup> -C)	metsu
<b>SULFONE</b>	
Dibenzothiophene sulfone (DBT avec S <sup>=O</sup> =O)	sulfon
L-Methionine sulfone, Sigma (CH <sub>3</sub> -S <sup>=O</sup> =O-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH(NH <sub>2</sub> )COOH)	metson
Poly(1,4-phenylene ether-sulfone) (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S <sup>=O</sup> =O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-O) <sub>n</sub>	ppeson
<b>SULFONIC ACID</b>	
Anthraquinone-2-sulfonic acid, Na salt (-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sur anthra)	antra
5-Sulfosalicylic acid dihydrate (SO <sub>3</sub> H-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-COOH, 2H <sub>2</sub> O)	ssal
ethyl sulfonic acid CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> Na (King)	etsat
<b>SULFATE</b>	
Gypsum	gyps2
FeSO <sub>4</sub>	feso4
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Na sulphate)	naso4
Dodecyl sulfate	dodsft
<b>SULFITE</b>	
sulfite NaSO <sub>3</sub>	naso3



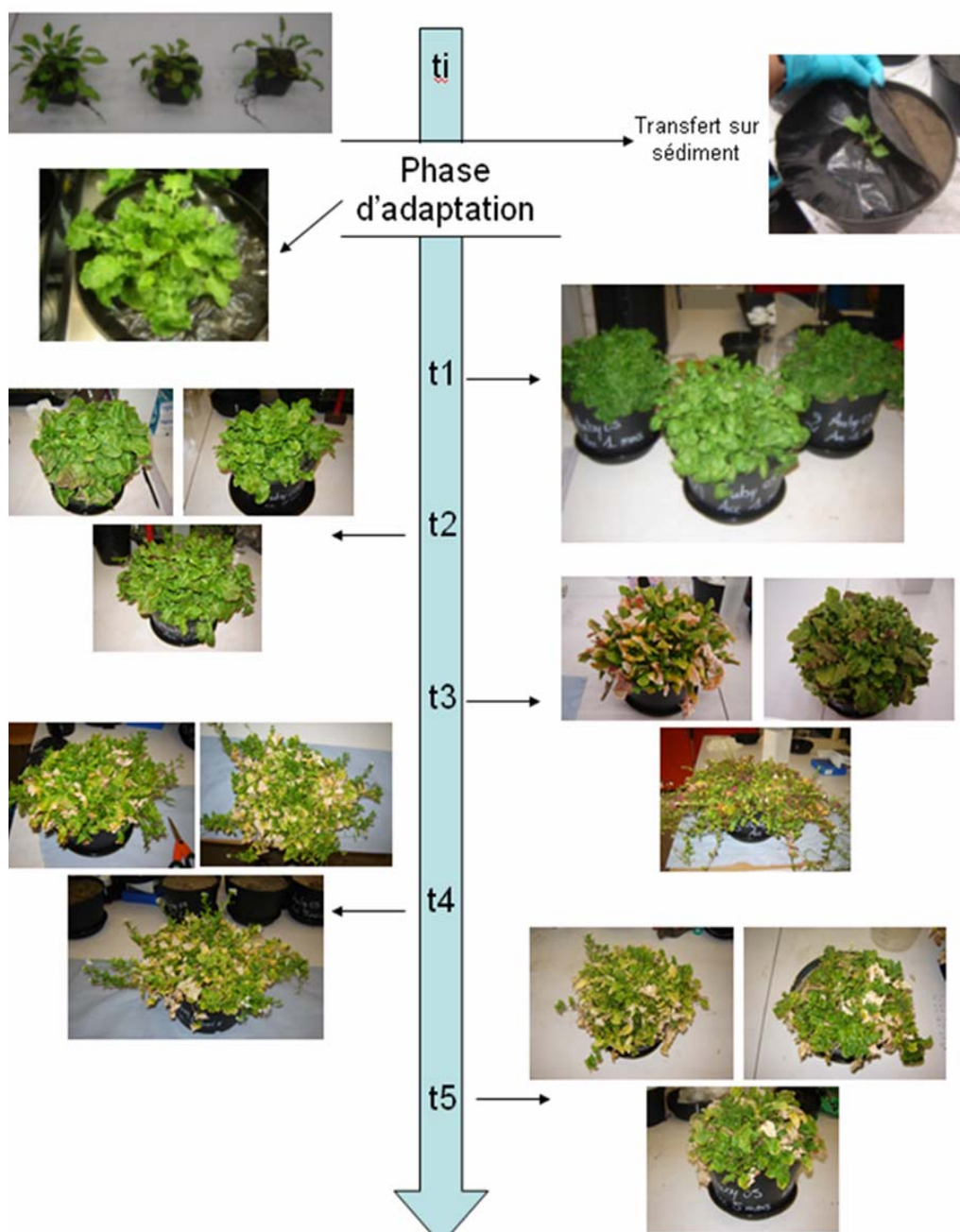


### Annexe II-3 : Mesures des diamètres des rosettes de *A. halleri*

	apres acclimatation		t = 1		t = 2		t = 3		t = 4		t = 5	
	10/01/2007		06/02/2007		07/03/2007		06/04/2007		04/05/2007		04/06/2007	
nom du pot												
Plante MET	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
Auby Acc 1 mois 1	20	21	35	34.7								
Auby Acc 1 mois 2	32	29	38.4	35.5								
Auby Acc 1 mois 3	21	16.2	30.3	28								
Auby Acc 2 mois 1	22	21.5	33	34	43.5	40						
Auby Acc 2 mois 2	21.6	22	29.5	28	37.5	36.5						
Auby Acc 2 mois 3	12	11	26	24	35.5	34.5						
Auby Acc 3 mois 1	15	17.5	22	21	28	30	33	35.5				
Auby Acc 3 mois 2	16.5	20.3	25	25	31	28	31.5	35				
Auby Acc 3 mois 3	23	28.5	24	29	25	30	44	42.5				
Auby Acc 4 mois 1	23	26.4	23	27	24	28	32	41	39	50.5		
Auby Acc 4 mois 2	15.5	17.4	24	28	32	32.5	34	32	37	29.3		
Auby Acc 4 mois 3	17.5	20.6	19	21	22	22	28	26	37.5	31		
Auby Acc 5 mois 1	8	12	22	19	31	28	31.5	29	24.5	26.5	23	23
Auby Acc 5 mois 2	16	14.5	25	23	43	38.5	44.5	39.5	43	38	39	34.5
Auby Acc 5 mois 3	24.2	21.3	26	28	29	31	35.7	33.3	33.5	32	30	28
Plante N-MET	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2	D1	D2
HF Acc 1 mois 1	11.5	10.5	29.5	30								
HF Acc 1 mois 2	9.5	10.5	16	21								
HF Acc 1 mois 3	13	11	21	21								
HF Acc 2 mois 1	12	12	22	23	34.5	34.5						
HF Acc 2 mois 2	19.5	21	23	22.5	28	25.5						
HF Acc 2 mois 3	15	13	24	23	32.5	30						
HF Acc 3 mois 1	21	19	25	21	26	24	26.5	26.5	25	26		
HF Acc 3 mois 2	17	11	26	22	26.5	23	24	19	23	19		
HF Acc 3 mois 3	13	15	20	18	25	22	22.5	23.5	21	22		
HF Acc 4 mois 1	9	9	21	19	25	24.5	26.5	28	27	32		
HF Acc 4 mois 2	11	11	23	21	27	26	29	28	33.5	30		
HF Acc 4 mois 3	12.5	16	22.5	24	23.5	25.5	26	27	25	25.5		
HF Acc 5 mois 1	26	26	30	29.5	33	32.5	34.5	32.5	26	29.5	24	22
HF Acc 5 mois 2	13.5	14	MORTE									
HF Acc 5 mois 3	19	23	26	30	30	34	31.5	34.5	32	33	27	26

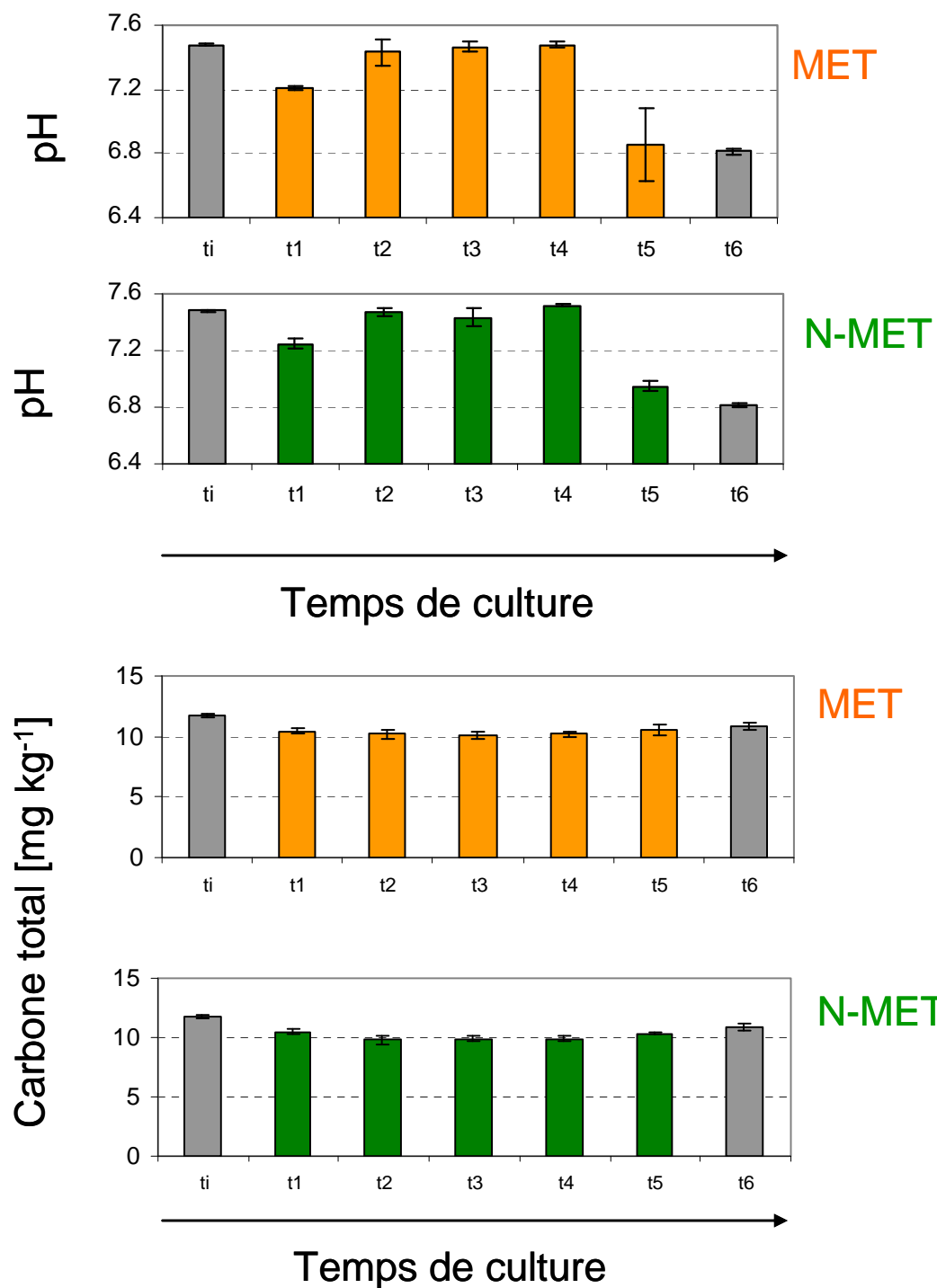


**Annexe II-4 : Evolution d'A. halleri d'origine MET au cours de l'expérience de culture sur sédiment**



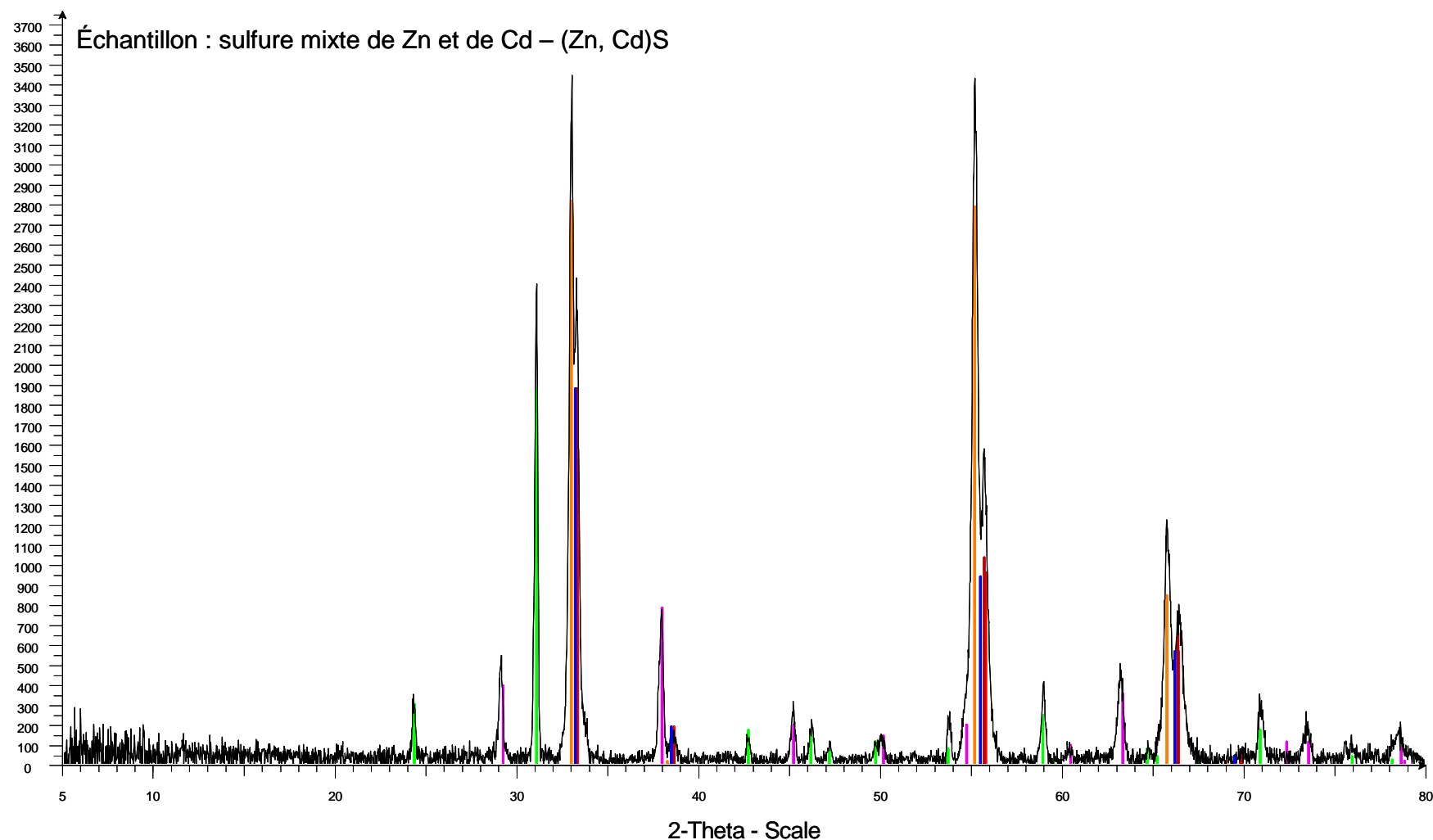


**Annexe II-5 : Evolution des paramètres physico-chimiques du sédiment au cours de la culture *A. halleri* : pH et teneur en carbone totale**





# Annexe II-6 : Spectre DRX du composé de référence d'un sulfure mixte de Zn et Cd



CDS LUCHON DOLOMIEU - File: CDS\_DOL.RAW - Type: 2Th/Th unlocked - Start: 4.990 ° - End: 79.990 ° - Step: 0.020 ° - Step time: 12. s - Temp.: 25 °C (Room) - Time Started: 0 s - 2-Theta: 4.990 ° - Theta: 0.000 ° - Chi: 0.  
 00-005-0566 (I) - Sphalerite, syn - ZnS - Y: 50.00 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Cubic - a 5.4060 - b 5.40600 - c 5.40600 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Face-centered - F-43m (216) - 4 - 157.989 - I/c PDF 3.9 -  
 00-024-1137 (D) - Sphalerite, cadmian, syn - Zn0.9Cd0.1S - Y: 50.00 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Cubic - a 5.434 - b 5.43400 - c 5.43400 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Face-centered - F-43m (216) - 4 - 160.  
 00-008-0449 (\*) - Smithsonite - ZnCO3 - Y: 20.84 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Rhombo.H.axes - a 4.6533 - b 4.65330 - c 15.028 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 120.000 - Primitive - R-3c (167) - 6 - 281.808 - I/c PDF 3.  
 00-046-1045 (\*) - Quartz, syn - SiO2 - Y: 50.00 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Hexagonal - a 4.91344 - b 4.91344 - c 5.40524 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 120.000 - Primitive - P3221 (154) - 3 - 113.010 - I/c PDF 3.4 -  
 00-023-1123 (I) - Iron Sulfide - FeS - Y: 50.00 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Cubic - a 5.419 - b 5.41900 - c 5.41900 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Face-centered - F-43m (216) - 4 - 159.132 - F13= 24(0.0390,1  
 01-077-2245 (C) - Calcium Fluoride - CaF2 - Y: 75.00 % - d x by: 1. - WL: 1.78901 - Cubic - a 5.46200 - b 5.46200 - c 5.46200 - alpha 90.000 - beta 90.000 - gamma 90.000 - Face-centered - Fm-3m (225) - 4 - 162.950 - I/c PD

Remarque: Sphalerite substituée par Cd (taux > 10%) + probable que CaF2





**Annexe 7 : Détermination du nombre de composantes utilisées pour les simulations par combinaisons linéaires en fonction du critère d'efficacité.**

Tableau A : Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil K du Cd, des différents échantillons de sédiment initial (avant culture) : sédiment total et ses différentes fractions granulométriques ainsi qu'un échantillon de sédiment lavé sous eau.

Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
Sédiment initial à <i>ti</i>	1	2415	
	2	2377	1
Fractions granulométriques			
fraction grossière (2000-500 µm)	1	5015	
	2	1506	70
	3	869	42
	4	659	24
< 50 µm	1	3855	
	2	1966	49
	3	1277	35
	4	920	28
< 2 µm	1	1799	
	2	968	46
	3	697	28
	4	538	23
< 0.2 µm	1	6312	
	2	5966	5
Sédiment lavé	1	2016	
	2	808	60
	3	593	27
	4	491	17

Tableau B: Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil L<sub>III</sub> du Cd, sur une pastille de sédiment initial et sur les différents spots enrichis en Cd présents dans le sédiment initial (avant culture) monté en lame mince.

Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
Sédiment initial (signal global)	1	0.0026	
	2	0.0026	
spot 1	1	0.0088	
	2	0.0079	10
spot 2	1	0.0072	
	2	0.0062	14
	3	0.0061	2

Tableau C: Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil K du S, sur une pastille de sédiment initial et sur les différents spots enrichis en Cd présents dans le sédiment initial (avant culture) monté en lame mince.

Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
sédiment initial (signal global)	1	0.14	
	2	0.08	46
	3	0.02	77
	4	0.01	56
	5	0.01	20
spot 1	1	0.031	
	2	0.017	45
	3	0.012	29
	4	0.008	33
	5	0.006	25
spot 2	1	0.049	
	2	0.016	67
	3	0.013	19
	4	0.008	39
	5	0.007	18

Tableau D : Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil K du Cd, des différents échantillons de sédiment végétalisé par *A. halleri* pour les deux origines (MET et N-MET) après 5 mois de culture et pour le sédiment non végétalisé à t6 (avant culture). Les données pour le sédiment initial et le sédiment lavé sont rappelées.

Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
<u>avant culture</u>			
Sédiment initial à <i>t<sub>i</sub></i>	1	2415	
	2	2377	1
Sédiment lavé	1	2016	
	2	808	60
	3	593	27
	4	491	17
<u>après culture</u>			
Sédiment seul à <i>t<sub>6</sub></i>	1	682	
	2	607	11
	3	491	19
	4	483	2
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine MET à <i>t<sub>5</sub></i>	1	735	
	2	607	17
	3	533	12
	4	445	17
Sédiment + <i>A. halleri</i> d'origine N-MET à <i>t<sub>5</sub></i>	1	749	
	2	650	13
	3	547	16
	4	470	14

Tableau E: Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil L<sub>III</sub> du Cd, sur les différents spots enrichis en Cd présents dans le sédiment après végétalisé par *A. halleri* pour les deux origines (MET et N-MET) après 5 mois de culture (monté en lame mince).

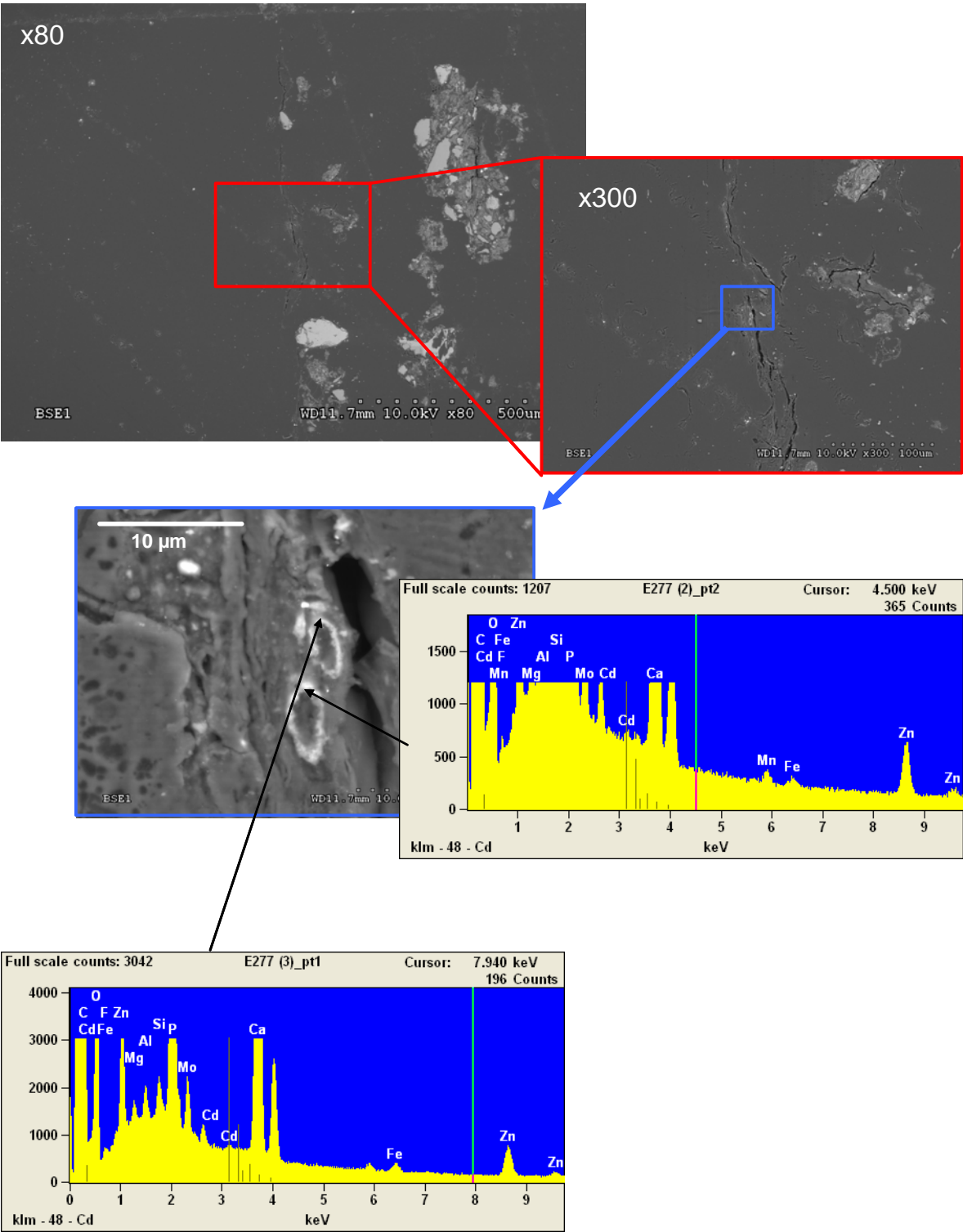
Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
orga	1	0.5931	
	2	0.5962	-0.5
pt 16	1	0.0512	
	2	0.0507	1.0
	3	0.0699	-37.9
pt 13	1	0.0139	
	2	0.0054	61.2
	3	0.0053	1.9
pt 19c	1	0.0211	
	2	0.0204	3.3
	3	0.0205	-0.5
pt 19b	1	0.0268	
	2	0.0096	64.2
	3	0.0096	0.0
pt 19a	1	0.0036	
	2	0.0024	33.3
	3	0.0022	8.3

Tableau F: Pour les combinaisons linéaires simulant les spectres expérimentaux, enregistrés au seuil K du S, sur les différents spots enrichis en Cd présents dans le sédiment après végétalisé par *A. halleri* pour les deux origines (MET et N-MET) après 5 mois de culture (monté en lame mince).

Noms des échantillons	Nombre de composantes pour la simulation	Efficacité	Diminution du critère "efficacité" par rapport au fit à n-1 composante (%)
orga	1	0.16	
	2	0.03	81
	3	0.02	36
	4	0.01	48
pt 16	1	0.18	
	2	0.06	64
	3	0.02	62
	4	0.01	53
pt 13	1	0.85	
	2	0.20	77
	3	0.08	58
	4	0.06	25
pt 19c	1	0.61	
	2	0.09	85
	3	0.07	27
	4	0.05	18
pt 19b	1	0.27	
	2	0.02	91
	3	0.02	32
	4	0.01	11
pt 19a	1	0.24	
	2	0.08	66
	3	0.04	45
	4	0.02	53















Annexe II-8 : Analyses MEB-EDS d'une racine d'*A. halleri* isolée du sédiment





Annexe III-1 : supply information SI-1 de l'article « autoradiographie »

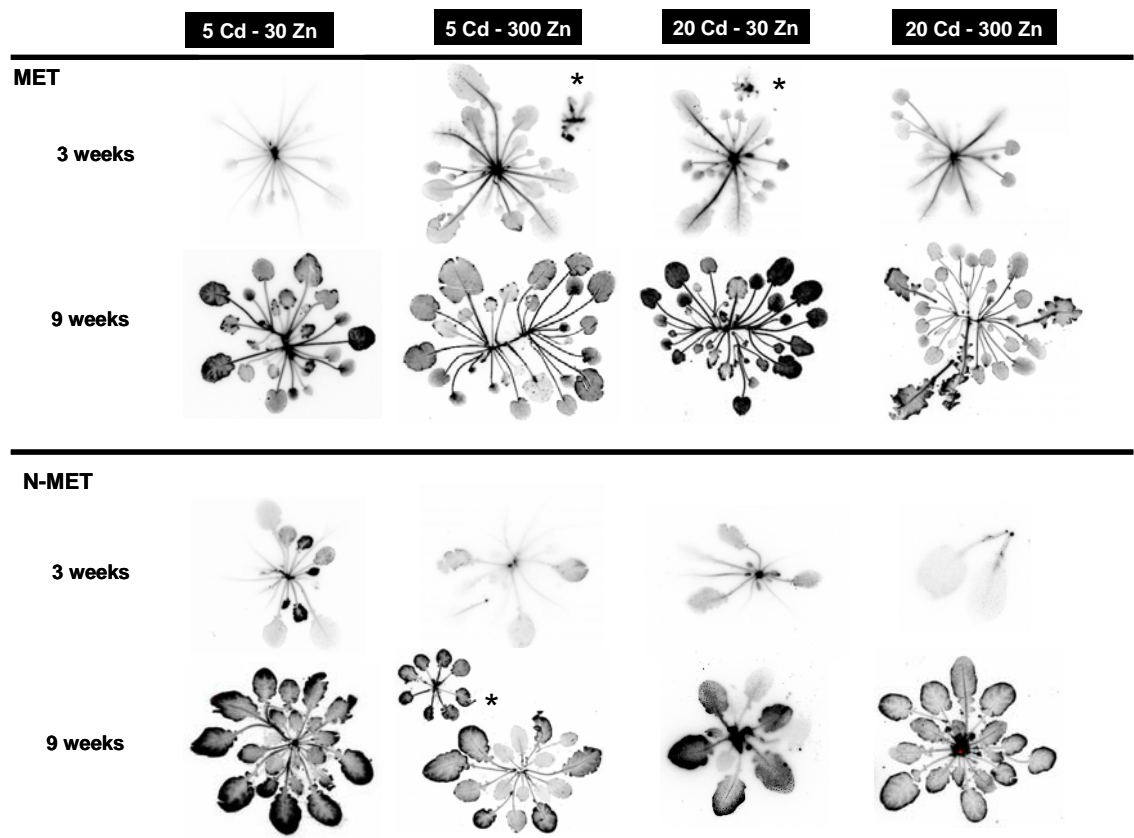
		Zn concentrations in hydroponic solutions			
Cd concentrations in hydroponic solutions	20µM	<b>30µM</b> 	<b>300µM</b> 	<b>30µM</b> 	<b>300µM</b> 
	5µM				
	0µM				
		<i>A. Halleri</i> from metallicolous origin		<i>A. Halleri</i> from non-metallicolous origin	

SI 1: *A. halleri* clones from metallicolous (MET) and non-metallicolous (N-MET) origin after 9 weeks culture in hydroponic solutions at various Cd and Zn concentrations. Each pot contains 3 clones.





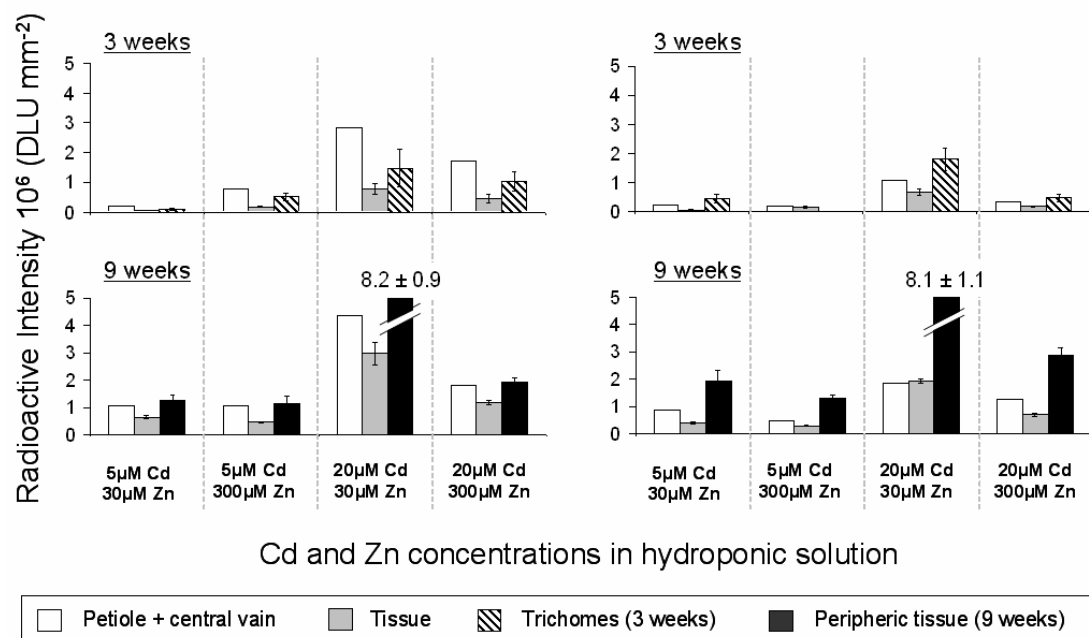
Annexe III-2 : supply information SI-2 de l'article « autoradiographie »



SI 2: Autoradiographs of *A. halleri* MET and N-MET exposed for 3 and 9 weeks to all  $^{*}C_{x/y}$  treatments. For clarity young leaves were detached from the rosette (\*).



### Annexe III-3 : supply information SI-3 de l'article « autoradiographie »

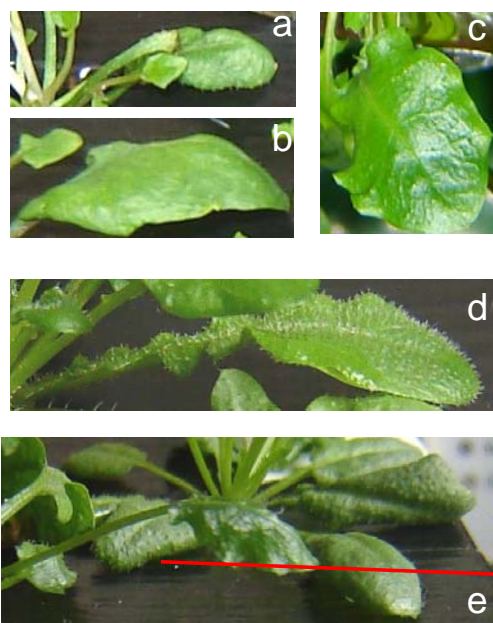


SI 3: Radioactive intensities per area measured in different compartments of a representative leaf of *A. halleri* from metalicolous origin (MET) and non metalicolous origin (N-MET), after 3 and 9 weeks exposure to <sup>109</sup>Cd and various Cd and Zn concentrations. Radioactive intensities were normalized to keep stable Cd/labelled Cd constant. For the 3 weeks clones, 3 compartments were defined: « Petiole + Central Vein », « Tissue » and « Trichomes », whereas for 9 weeks clones, the studied compartments were « Petiole + Central Vein », « Tissue » and « Peripheral Tissue ». Bars represent  $\pm$  standard deviations (n=1 for “petiole + Central Vein” compartment, n=5 for “Tissue” and “Peripheral Tissue” compartments, n=10 for “Trichomes” compartment).

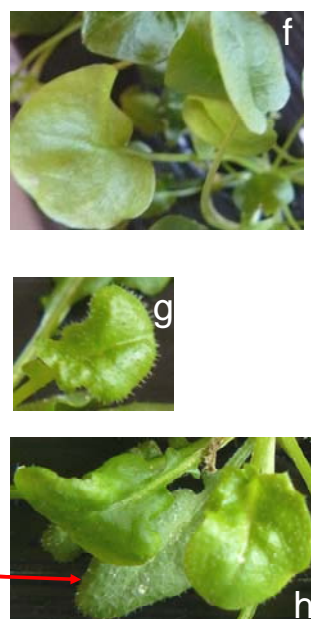


**Annexe III-4 : supply information SI-4 de l'article « autoradiographie »**

Before growth on Cd and Zn treatments




After 9-week growth culture on Cd and Zn treatments



SI 4: Photographs of *Arabidopsis halleri* from metallicolous origin (a-c, f) and from non-metallicolous origin (d-e, g-h) before (left) and after (right) 9-week growth on Cd and Zn treatments.



## Annexe III-5 : protocole de dosage des phytochelatines et du glutathion

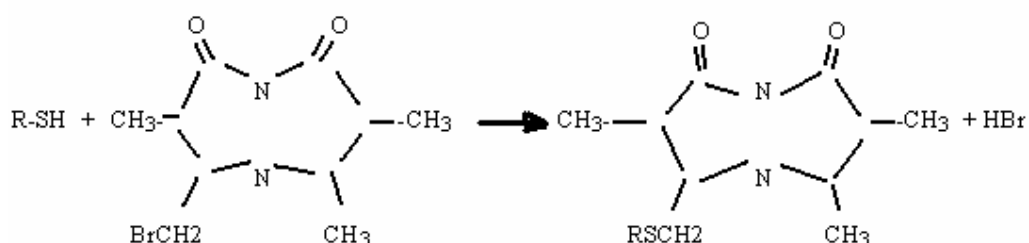
Author: Petra Date: 5-4-2002 Version 2	Standard Protocol <b>Ecology and Physiology of Plants</b> Vrije Universiteit	
--	--	---

### Extraction and derivatisation of phytochelatins using monobromobimane and separation on HPLC

	Page
1. Principle	1
2. Chemicals	2
3. PC-extraction	3
4. PC-derivatisation	4
5. Start up HPLC	4
6. Computer	6
7. Switch of HPLC	7
8. Trouble shooting HPLC	8
9. Gradient tables PC analysis by the mBBBr-derivatisation	9

#### 1. Principle

Phytochelatins are peptides with the structure  $(\gamma\text{-glu-cys})_n\text{-gly}$ , in which  $n$  can range from 2-11. When  $n=1$ , this tripeptide is called glutathion. The peptides bind metals by the S-atom of the thiolgroup (SH-) of cysteine. Thiol-containing structures like cysteine, glutathion and phytochelatins can be separated via reverse-phase HPLC. Before sample injections the thiol groups are derivatised with the fluorescent component monobromobimane:



Electrons within this structure can be excited with light of 380 nm (excitation-wavelength) and when falling back to their basis situation send light of 470 nm (emission-wavelength). The excitation and emission wavelength are respectively send and received in the detector of the HPLC.

## 2. Chemicals

- **20 mM monobromobimane in acetonitril**

Dilute monobromobimane (stock 100 mM) 5 times in acetonitril in eppendorf. Keep in dark at 4 °C.

- **200 mM HEPPS - 6.3 mM DTPA**

Dissolve 5.047 g HEPPS and 248.7 mg DTPA in 90 ml superdemi.  
Bring pH to 8.2 with 4 N KOH and fill up to 100 ml.  
Filtrate through 0.2 µm bacteria-filter using a syringe. Keep at 4 °C.

- **1 M MSA (methane-sulfonic-acid)**

Dilute concentrated MSA: 1.3 ml MSA in 18.7 ml superdemi. Keep in flow cabinet.

- **6.3 mM DTPA - 0.1 % TFA**

Dissolve 0.6 g DTPA in 250 ml superdemi. Keep in refrigerator.  
Right before use add necessary amount TFA: 1 µl TFA per ml DTPA.

- **Standard solutions NAC and GSH**

10 mM NAC: 16.3 mg NAC in 10 ml DTPA-TFA → 1 mM NAC: dilute 10 x

10 mM GSH: 30.7 mg GSH in 10 ml DTPA-TFA → 1 mM GSH: dilute 10 x

Final concentrations depend on the samples.

<i>GAIN</i>	<i>GSH concentrations</i>	<i>NAC concentration</i>
10	100, 75, 50 and 25 µM	50 µM
100:	20, 15, 10 and 5 µM	10 µM
1000:	1, 0.75, 0.5 and 0.25 µM	1 µM

- **Solvents for HPLC run**

A.	methanol + 0.1% TFA	filter (0.45 µm)	pH ±2.5
B.	superdemi, 100%	filter (0.22 µm)	pH ±7.5
C.	superdemi + 0.1% TFA,	filter (0.22 µm)	pH ±2.5
D.	methanol, 100%	filter (0.45 µm)	

(1 µl TFA per ml superdemi/methanol)

*MBrB: Sigma B4380 refrigerator A214 nr 232*

*acetonitril: Baker 9017-51 flow cabinet A223)*

*HEPPS: Fluka 54465 nr 352*

*DTPA: Sigma D-1133 nr 673, A214*

*MSA: Fluka 64280, flow cabinet A221*

*TFA: Riedel de Haan 61030, flow cabinet A221*

*NAC: Sigma A8199 nr 234*

*GSH: Sigma G4251 nr 462, refrigerator A214*

*MeOH: HPLC-graded flow cabinet A223,*

- PCs will be separated on a Nova-Pak C18 analytical column (60 Å, 4 µm, 3.9\*300 mm; Waters catalog no. 11695), kept at 37 °C using the column oven.
- Guard-Pak™ Inserts: Nova-Pak 4 µm 60 Å C18, HPLC pre column inserts, Waters catalog no. 15220.



### 3. PC extraction

- all solutions on ice
  - 40 ml 6.3 mM DTPA + 40  $\mu$ l TFA (for  $\pm$  12 samples)
  - 1 mM NAC in DTPA-TFA (for GAIN 100)
  - 1 mM GSH in DTPA-TFA (for GAIN 100)
  - HEPPS-DTPA
- weigh material ( $\pm$ 6 samples at the time) (*Average: root 20 mg, shoot 25 mg*)
- material in mortar
  - + quartz sand
  - + 990  $\mu$ l DTPA-TFA
  - + 20  $\mu$ l NAC
  - homogenise
  - + 990  $\mu$ l DTPA-TFA
- mix , put in 2 ml eppendorf
- centrifuge on eppendorf-centrifuge (13.000 rpm) for 10-15 minutes 4 °C
- prepare GSH standards for every new run, treat as samples

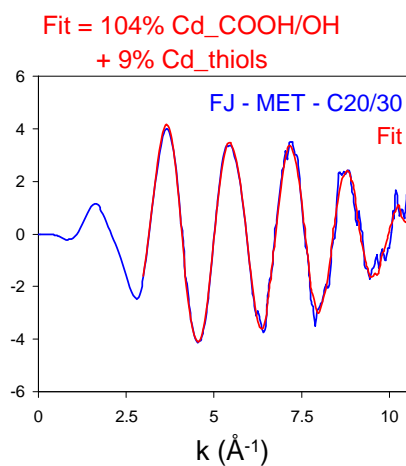
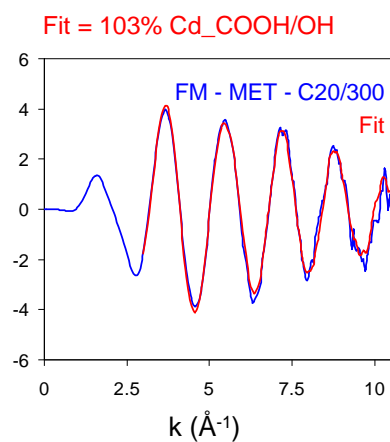
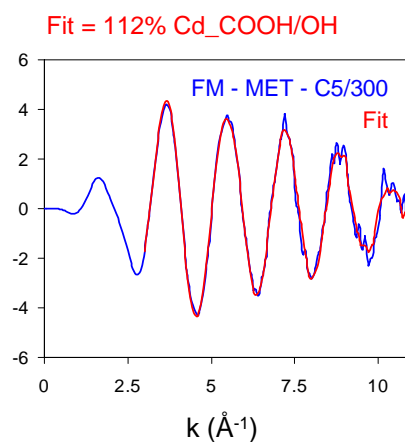
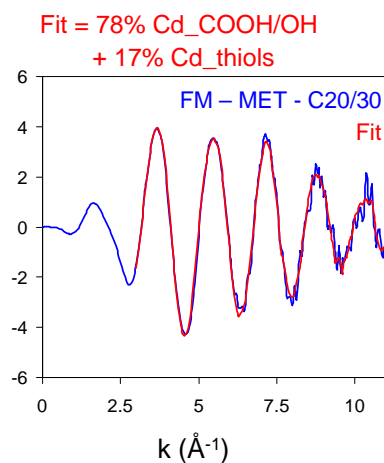
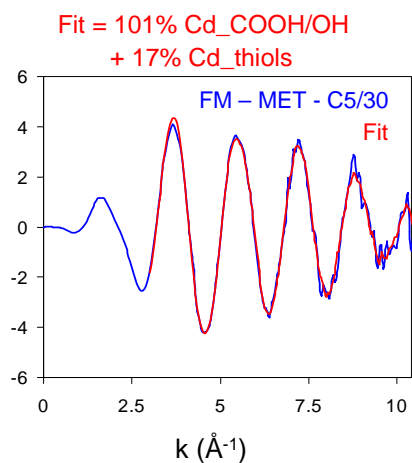
<i>For GAIN 100: final GSH</i>	<i>1mM GSH</i>	<i>1mM NAC</i>	<i>DTPA-TFA</i>
<i>20 <math>\mu</math>M</i>	<i>20 <math>\mu</math>l</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>	<i>970 <math>\mu</math>l</i>
<i>15 <math>\mu</math>M</i>	<i>15 <math>\mu</math>l</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>	<i>975 <math>\mu</math>l</i>
<i>10 <math>\mu</math>M</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>	<i>980 <math>\mu</math>l</i>
<i>5 <math>\mu</math>M</i>	<i>5 <math>\mu</math>l</i>	<i>10 <math>\mu</math>l</i>	<i>985 <math>\mu</math>l</i>

- 500  $\mu$ l supernatant in Costar-spin-filter eppendorf (0.2  $\mu$ m)
- spin shortly
- remaining supernatant in eppendorf for metal analysis
- Prepare a sample from VU reference material once. *Silene vulgaris* (VU), 3 days 40  $\mu$ M Cd. For reference on retention times of PC peaks, include in every run. Make mixtures of your sample with reference sample to identify PC-peaks

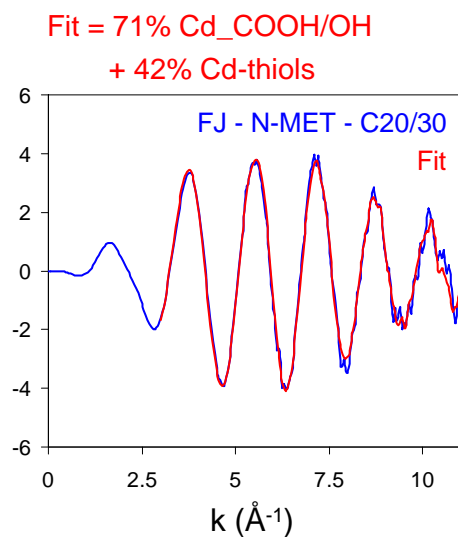
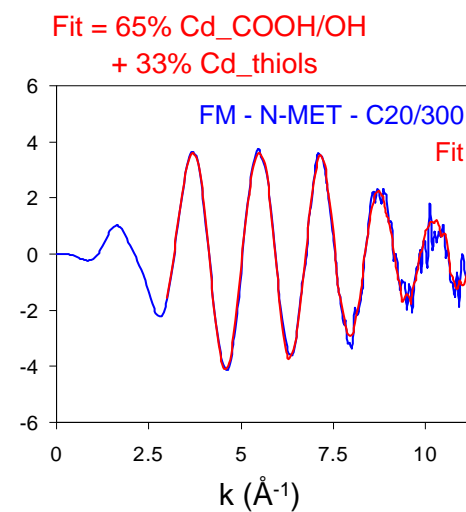
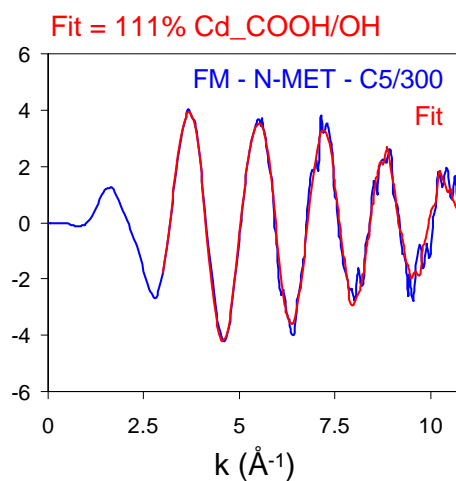
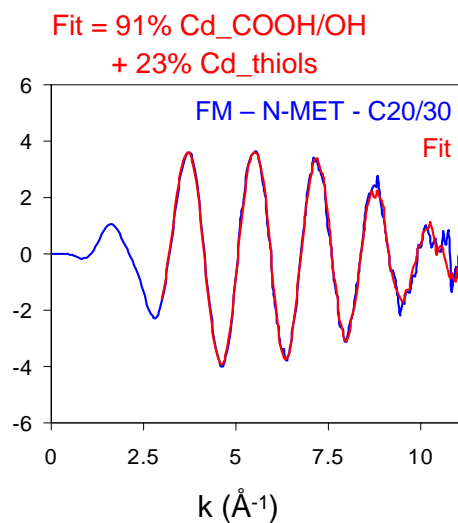
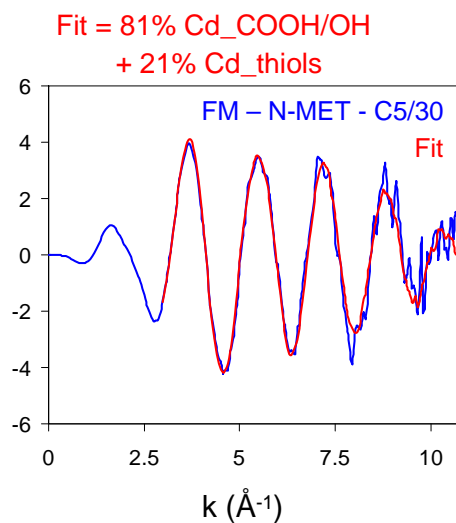
#### 4. PC- derivatisation

- pipette into auto-sampler vial:
  - 10  $\mu$ l monobromobimane
  - 450  $\mu$ l HEPPS-DTPA
  - 250  $\mu$ l sample (blanc: DTPA-TFA)
- close vial and vortex
- 30 min. at 45 °C in the dark
- add 300  $\mu$ l 1 M MSA to stop reaction
- close vial and mix
- store sample at 4 °C

## A. *halleri* d'origine métallicole



## A. *halleri* d'origine non-métallique









## ETUDE DU DEVENIR DU CADMIUM DANS UN SEDIMENT DE CURAGE FORTEMENT CONTAMINE ET DES MECANISMES D'ACCUMULATION DU CADMIUM CHEZ *ARABIDOPSIS HALLERI*



---

### RESUME :

La maintenance des voies navigables par dragage génère de grands volumes de sédiments, souvent contaminés en métaux. Pour certains d'entre eux, un traitement par phytoextraction pourrait être envisagé. Le premier volet de ce travail vise à étudier le devenir du Cd présent dans un sédiment de curage contaminé par des métaux lors de la culture d'*A. halleri*, plante hyperaccumulatrice de Zn et Cd. Pour cela, un suivi des teneurs en Cd a été réalisé dans le sédiment, les parties aériennes de la plante et les lixiviats lors de la culture en pot. La présence de plantes diminue la quantité de Cd lixivié, mais ne modifie ni la fraction échangeable ni le pool phytodisponible en Cd. La spéciation a été étudiée par spectroscopie EXAFS et  $\mu$ XANES, la localisation par  $\mu$ XRF et MEB-EDX, et la biodisponibilité par DGT et extraction au  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ . Avant culture, le Cd est présent sous forme d'un sulfure mixte de Zn, Cd et Fe. Après 5 mois de culture, cette espèce est totalement oxydée en présence de plantes et presque totalement dans les pots sans plante. Les espèces de Cd néoformées sont des complexes Cd-acides organiques et du Cd-phosphate. Le second volet de ce travail porte sur les mécanismes d'accumulation du Cd dans les parties aériennes d'*A. halleri*. Après culture en hydroponie, l'analyse des parties aériennes par autoradiographie en utilisant  $^{109}\text{Cd}$  montre que le métal est transféré aussi bien dans les feuilles jeunes que les matures, ces dernières montrant un enrichissement des tissus périphériques. L'analyse des feuilles par spectroscopie EXAFS a montré que le Cd était lié principalement à des ligands organiques de type COOH/OH, et de façon minoritaire à des ligands de type thiols.

---

### ABSTRACT :

The cleaning of waterways by regular dredging generates great volumes of sediments which often contain large amounts of metals. For some of them, a treatment by phytoextraction could be considered. The first part of this work focuses on the fate of Cd present in a metal-polluted dredged sediment during the culture of *Arabidopsis halleri*, a Zn and Cd hyperaccumulating plant. In this purpose, a five month pot experiment was done. Cd contents in the sediment, in the aerial parts of plant and in the leachates were measured each month in planted and non planted pots. The presence of plants decreases the amount of leached Cd, but does not influence the Cd exchangeable fraction and the Cd phytoavailable pool. Cd speciation in the sediment was studied by EXAFS and  $\mu$ XANES spectroscopy, Cd localization by  $\mu$ XRF and SEM-EDX, and Cd bioavailability by DGT and  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  extraction. Before culture, Cd is present as mixed Zn, Cd and Fe sulphide of. After 5 months of culture, this species is totally oxidized in presence of plants and almost totally in the control pot without plant. Secondary Cd species include Cd- organic acid complexes and Cd-phosphate. The second part of this work focuses on the mechanisms of Cd accumulation in the aerial parts of *A. halleri*. After hydroponic culture, the study of the aerial parts by autoradiography using  $^{109}\text{Cd}$  showed that Cd was stored both in young and mature leaves, the latter showing a metal enrichment in the peripheral parts. The EXAFS study of the leaves showed that Cd was predominantly bound to COOH/OH-type organic ligands, and to a minor extent to thiol ligands.

---